

**Aus dem Pathologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner

**Latenz-assoziiertes-nukleäres-Antigen (LANA) des
Humanen-Herpesvirus 8 (HHV 8) im AIDS-assoziierten
Kaposi-Sarkom**

Immunhistochemische Untersuchungen von LANA zur Quantifizierung
und Verteilung sowie Koexpression mit zellulären Proteinen

Dissertation

**zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von

Peter Nikolai Lorenz

aus

Darmstadt

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. C. Zietz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. J. Haas
Priv. Doz. Dr. med. R. Wienecke
Priv. Doz. Dr. med. H. Adler

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2007

Für meinen Vater

Dr. ing. Rudolf Werner Lorenz

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
2 Fragestellung und Zielsetzung	3
3 Theoretische Einführung	5
3.1 Kaposi-Sarkom	5
3.1.1 Klinische Einteilung	7
3.1.2 Histopathologische Einteilung	7
3.1.3 Dissemination des Kaposi-Sarkoms	8
3.1.4 Epidemiologische Formen des Kaposi-Sarkoms	8
3.2 Humanes-Herpes-Virus 8 (HHV 8).....	12
3.3 Weitere HHV 8-assoziierte Erkrankungen.....	13
3.3.1 Primary Effusion Lymphoma (PEL)	13
3.3.2 Multizentrischer Typ des Morbus Castleman	16
3.4 Gemeinsame Eigenschaften der Herpesviren.....	17
3.5 Proteine von HHV 8 und deren Eigenschaften	20
3.5.1 LANA: Funktion und Regulation	22
3.5.2 Virales Cyclin (vCYC; ORF 72)	26
3.5.3 Virales Interleukin-6 (vIL 6; ORF K2)	29
3.5.4 Viraler G-Protein-gekoppelter Rezeptor (vGPCR; ORF 74)	31
3.5.5 Virale macrophage inflammatory Proteins (vMIP I-III; ORF K4, K4.1, K6)	32
3.6 Funktion und Regulation von Zykluskontrollproteinen	32
3.6.1 Ki67: Funktion und Regulation	32
3.6.2 Cyklinkinase Inhibitoren	33
3.6.3 Interferon- α (IFN α) und dessen Rolle im KS	41
3.7 Funktion und Expressionsmuster von CD31 und CD34	42
3.7.1 CD31 (PECAM-1)	42
3.7.2 CD34	43
4 Material	45
4.1 Patientenkollektiv	45
4.1.1 Diagnostische Exzise von Kaposi-Sarkomen	45
4.1.2 Sektionsmaterial	45
4.2 Histopathologische Basisdiagnostik	46
5 Methoden.....	47
5.1 Theoretische Grundlagen der Immunhistologie	47
5.1.1 Grundlegende Prinzipien der Immunhistologie	47
5.1.2 Immunhistochemische Koexpression	49
5.1.3 Immunhistochemischer Nachweis von LANA am Sektionsmaterial	50
5.2 Eigenschaften der verwendeten Primärantikörper	51
5.3 Praktische Durchführung der Immunhistologie.....	52
5.3.1 Fixierung, Einbettung und Vorbehandlung der Gewebeprobe	52
5.3.2 Verwendete immunhistochemische Detektionsmethoden	54
5.3.3 Praktische Durchführung der immunhisto-chemischen Koexpression	59
5.3.4 Gegenfärbung, Einbetten und Asservierung des Präparats	60
5.4 Auswertung und Kontrollen	61
5.4.1 Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse für die KS-Biopsate	61
5.4.2 Auswertung des Sektionsmaterials	61
5.4.3 Kontrollen	62
5.4.4 Sicherheitsvorkehrungen	62
6 Ergebnisse	63
6.1 Technischer Teil: Etablierung immunhistochemischer Experimente.....	63
6.1.1 Etablierung der Monoexpression von LANA	63
6.1.2 Etablierung der Koexpression von Ki67 mit LANA	64
6.1.3 Etablierung der Koexpression von p21 ^{clp1/waf1} mit LANA	65
6.1.4 Etablierung der Koexpression von LANA mit CD31 und LANA mit CD34	66
6.1.5 Weiterführende Koexpressionsversuche mit LANA	67
6.1.6 Etablierung des Nachweises von LANA am Sektionsmaterial	69
6.2 Ergebnisorientierter Teil der etablierten Experimente	70

6.2.1	Quantifizierung der LANA-positiven Zellen im Kaposi-Sarkom.....	70
6.2.2	Zelldichte des Kaposi-Sarkoms im Früh- und Spätstadium	72
6.2.3	Ergebnisse der Koexpression Ki67 mit LANA.....	72
6.2.4	Ergebnisse der Koexpression für LANA mit p21 ^{waf1/cip1}	75
6.2.5	Ergebnisse der Koexpression von LANA mit CD31	76
6.2.6	Ergebnisse der Koexpression von LANA mit CD34	78
6.2.7	Deskriptive Analyse der Ergebnisse von LANA mit CD31 und CD34.....	79
6.2.8	Zusammenfassung der Ergebnisse an KS-Biopsaten	83
6.2.9	Ergebnisse von LANA am Sektionsmaterial	83
7	Diskussion	87
7.1	Dissemination mononukleärer LANA-positiver Zellen	89
7.2	Untersuchung zur endothelialen Zielzelle im KS	91
7.2.1	Nachweis von CD31 und CD34 in LANA-positiven Zellen und Gefäßen.....	92
7.2.2	Betrachtungen zum Zellverband im KS.....	94
7.3	Differenzierung der HHV-8-infizierten und nicht-infizierten Zellen des KS mit LANA	95
7.4	Diskussion der Dignität HHV-8-assoziiierter Erkrankungen.....	97
7.4.1	Beurteilung der Proliferation im Kaposi-Sarkom	97
7.4.2	Differenz im Expressionsmuster von KS und Primary Effusion Lymphoma (PEL)	101
7.4.3	Vergleich des KS mit dem multizentrischen Typ des Morbus Castleman (MCD).....	103
8	Zusammenfassung.....	105
9	Literaturverzeichnis	107
10	Anhang	133
	Patientendaten	133
	Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	136
	Rezepturen.....	137
	Detektionskits für die Immunhistochemie.....	138
	Firmenverzeichnis.....	139
	Danksagung	140
	Lebenslauf.....	141

Abkürzungsverzeichnis

' und ''	Minuten und Sekunden	IRSE	IFN-responsive Element
ABC	Avidin-Biotin-Komplex-System	J	Jahr
ABC-Elite	ABC-Elite Mouse+Rabbit IgG	Kb	Kilobasen
ABC-Elite-Rat	ABC-Elite Rat IgG	Ki67 ⁺	Ki67-positive Zellen
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol	KS	Kaposi-Sarkom
AIDS	Aquired immune defficiency Syndrome	KS-A	Angiomatoide Frühform der KS
ALL	Akute Lymphatische Leukämie	KS-S	Sarkomatoide Spätform des KS
AP	alkalische Phosphatase	KSHV	Kaposi-Sarkom assoziiertes Herpesvirus (HHV 8)
APAAP	alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase	LANA	Latency associated nuclear Antigene (ORF73) von HHV 8
APAAP-M	APAAP-Maus	LANA ⁺	LANA-positive Zellen
APAAP-R	APAAP-Ratte	LANA-2	Latency associated nuclear Antigene-2 (ORF10.5) von HHV 8
APAAP-spez.	APAAP-spezial	LK	Lymphknoten
Aqua dest.	Destilliertes Wasser	LSAB	Labeled Streptavidin-Biotin
CD	Cluster of differentiation	m	männlich
CD31 ⁺	CD31-positive Zellen	MCD	Multicentric Castleman's disease
CD34 ⁺	CD34-positive Zellen	MEF	mäuseembryo Fibroblasten
CDC	Center of Disease Control	MHV-68	Murines Herpesvirus-68
Cdk	Cyclin dependend Kinase	MNDA	human myeloid cell nuclear differentiation Antigene
C/EBP- α	CCAAT/Enhancer-Binding Protein- α	M-Schleimhaut	Mundschleimhaut
CKI	Cylinkinase Inhibitor	n.a.	nicht auswertbar
HCMV	Humanes-Cytomegalie-Virus	NHL	Non Hodgkin Lymphom
DHFR	Dihydrofolat Reduktase	No.	Fallnummer
DM	"DAKO-Medium" (Antibody Diluent, Art. S-3022, DAKO)	n.u.	nicht untersucht
DMSO	Dimethylsulfoxid	ORF	open reading frame
EBV	Epstein Barr Virus	ori-P	origin of Replikation
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure	OS	Oberschenkel
ENV	Envision-System	p21	Cylinkinase Inhibitor p21 ^{waf1/cip1}
h	Stunden	p21 ⁺	p21-positive Zellen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	Rb	Retinoblastoma Protein
HCl	Salzsäure	PBS	Phosphat buffered Saline
HHV	Humanes-Herpes-Virus	PCR	Polymerase Kettenreacion
HRP	Meerrettichperoxidase	PDGF	platelet derived growth factor
HRAS	harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	PE	Probeentnahme (Biopsie)
HVS	Herpesvirus Samiri	PEL	Primary Effusion Lymphoma
IFN	Interferon	POL	DNA Polymerase- α
Ig	Immunglobulin	Prim.-AK	Primärantikörper
IL	Interleukin	RDA	Repräsentative Differentialanalyse
Inkub.	Inkubationsparameter	RM	„Rotes Medium“ s. Rezepturen
		RT	Raumtemperatur

s	<i>Standardabweichung</i>
TBS	<i>Tris-buffered-Saline Puffer</i>
TK	<i>Thymidin Kinase</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TPA	<i>12-O-Tetradecanoyl Phorbol-13-Acetat</i>
Tris	<i>Trishydroxymethylaminomethan</i>
TR	<i>Terminal repeats</i>
TRS 6	<i>Target retrieval solution, pH 6</i>
TRS 9	<i>Target retrieval solution, pH 9</i>
TS	<i>Tymidylat Synthase</i>
ÜN	<i>über Nacht</i>
v	<i>viral</i>
vCyc	<i>virales Cyclin (ORF72) des HHV 8</i>
vFLIP	<i>viral FLICE inhibitory Protein</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Verd.	<i>Verdünnung</i>
VM	<i>Verdünnungsmedium</i>
vMIP-I,-II,-III	<i>Viral Makrophage Inflammatory Proteins</i>
VZV	<i>Varizella Zoster Virus</i>
w	<i>weiblich</i>
WT	<i>Wildtyp</i>

1 Einleitung

Bereits 1911 wurde mit der Isolation des Avian-Virus und dessen Assoziation zum Rous-Sarkom die Möglichkeit einer viralen Beteiligung an der Entstehung von Tumoren in Betracht gezogen (Rous 1911). Mittlerweile ist unumstritten, dass Viren in der Pathogenese vieler Tumoren eine essentielle Rolle spielen.

Bei der Tumorentstehung durch kanzerogene Faktoren steht die Beeinflussung der Zellzykluskontrolle an erster Stelle. Im Unterschied zu Noxen liegt bei Onkoviren die Ursache des autonomen Zellzyklus nicht in einer zufällig entstandenen Mutation des Genoms, vielmehr findet eine gezielte Interaktion von mehreren viralen Proteinen mit zellulären Proteinen statt, wodurch der zelluläre Stoffwechsel so manipuliert wird, dass er unter anderem die virale Replikation begünstigt. Dies geschieht auf unterschiedlichste Weise. Erkenntnisse hierüber tragen grundlegend zum Verständnis der Kanzerogenese, des Zellzyklus und der Apoptose bei.

Das Humane-Herpesvirus 8 (HHV 8) ist ein Onkovirus, das unter anderem in der Pathogenese des Kaposi-Sarkoms (KS) eine essentielle Rolle spielt. HHV 8 kodiert viele verschiedene Gene, die onkogene Eigenschaften besitzen. Eines dieser viralen Proteine ist das Latenz-assoziierte-nukleäre-Antigen (LANA). LANA ist ein multifunktionelles Protein, dem unter anderem eine Einflussnahme auf Zellzykluskontrolle, Apoptose und der Persistenz von HHV 8 in der infizierten Zelle zugeschrieben wird.

Der immunhistochemische Nachweis von LANA an *Ex-vivo*-Material dient in dieser Arbeit der Trennung von infizierten LANA-positiven Zellen und nicht-infizierten Zellen des morphologisch inhomogenen KS.

2 Fragestellung und Zielsetzung

In dieser Arbeit wird zur Differenzierung infizierter Zellen LANA zusammen mit anderen Proteinen durch immunhistochemische Koexpression im KS nachgewiesen. Mit diesem Verfahren besteht die Möglichkeit in einem Kollektiv, bestehend aus Früh- und Spätstadien des KS, stadienabhängige Veränderungen der Proteinexpression in den infizierten und nicht-infizierten Zellen zu registrieren. Außerdem wird LANA immunhistochemisch an Sektionsmaterial nachgewiesen, um im gesamten Organismus nach infizierten Zellen suchen zu können.

Bisher ist unklar, wie das Virus vom Ort der Transfektion zur Zielzelle des KS gelangt. Es gibt Hinweise, dass die Dissemination über infizierte B-Lymphozyten stattfindet (Ambroziak 1995, Mesri 1996). Diesbezüglich führten wir immunhistochemische Färbungen mit LANA an unterschiedlichen Geweben aus Sektionsmaterial von Obduktionen durch. Ziel dieses Versuchs ist es, vereinzelte mononukleäre Zellen im Blut und insbesondere im Interstitium dieser Gewebe zu detektieren.

Außerdem besteht Unklarheit, ob die infizierte Zelle des KS lymph- oder blutendothelialen Ursprungs ist. Zur Erörterung führten wir Koexpressionen von LANA mit den Endothelzellmarkern CD31 und CD34 durch. Um den Anteil von infizierten Zellen in Abhängigkeit des Stadiums ermitteln zu können, wurde LANA im Früh- und Spätstadium des KS quantifiziert. Darüber hinaus wird die Dignität des KS kontrovers diskutiert. Diesbezüglich ist es notwendig, mehr über die proliferativen Eigenschaften des KS zu erfahren, weshalb wir LANA mit einem Schlüsselprotein der Apoptose (p21) und einem Proliferationsmarker (Ki67) koexprimiert haben. Hiermit kann die Proliferationskinetik ermittelt und auch beurteilt werden, ob die Proliferation des KS von infizierten oder womöglich nicht-infizierten Zellen ausgeht.

3 Theoretische Einführung

3.1 Kaposi-Sarkom

Das Kaposi-Sarkom ist ein vaskulärer Tumor, der 1872 von Moritz Kaposi (alias Kohn, geb. 1837 bei Kaposvar) als „idiopathisches multiples Pigmentsarkom der Haut“ erstmals beschrieben wurde (Kaposi 1872). Lange Zeit bestand Uneinigkeit über die Namensgebung dieser Erkrankung. Diverse Vorschläge zur deskriptiven Bezeichnung der Erkrankung wurden erwogen, bis Sternberg nach dem Tod von Moritz Kaposi den Namen „Kaposi-Sarkom“ nach dem Erstbeschreiber etablierte (Ober 1988). Der Streit über die Namensgebung zeigt deutlich, dass seit der Erstbeschreibung Unklarheit über die formale Pathogenese und die Dignität des Kaposi-Sarkoms bestand, die bis heute noch nicht ausreichend geklärt ist.

Im Jahre 1972, also genau hundert Jahre nach der Erstbeschreibung, entdeckte die Arbeitsgruppe von Giraldo et al. herpesvirusähnliche Partikel in Zellkulturen von KS-Proben von unterschiedlichen geographischen Regionen (Giraldo 1972). Damals wurde eine Assoziation mit dem Humanen-Cytomegalie-Virus (HCMV) angenommen (Giraldo 1980). Möglicherweise wurde der Entdeckung viraler Partikel aufgrund der Seltenheit des KS wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Erst mit dem häufigen Auftreten bei jungen homosexuellen Männern gewann das KS wieder an wissenschaftlicher Relevanz (Friedman-Kien 1981). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein bisher noch unbekanntes infektiöses Agens an der Entstehung des KS beteiligt ist.

Im Jahre 1994 gelingt der Arbeitsgruppe von Chang und Moore ein wissenschaftlicher Durchbruch. Sie konnte zwei virale DNA-Fragmente aus HIV-assoziierten Kaposi-Sarkomen mittels repräsentativer

Differenzialanalyse (RDA) isolieren, die Homologien zu Capsid-Proteinen von zwei Herpesviren, dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und dem Herpes-Virus-Samiri (HVS), aufweisen (Chang 1994). Bald darauf erfolgt der Nachweis, dass dieses „Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus“ Endothelzellen und Spindelzellen im KS infiziert (Boshoff 1995). Im Jahre 1996 konnte das gesamte Genom des neu entdeckten Herpesvirus sequenziert werden (Russo 1996). Mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen waren auch Capsid-Strukturen im KS nachweisbar (Orenstein 1997), die schließlich dreidimensional dargestellt werden konnten (Wu 2000).

Das neu entdeckte Herpesvirus wird deskriptiv als Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (KSHV) und formal als Humanes-Herpes-Virus 8 (HHV 8) bezeichnet. HHV 8 konnte in allen vier epidemiologischen Formen nachgewiesen werden (Moore 1995) und gilt als essentieller Faktor in der Pathogenese des KS.

Im Hinblick auf die formale Pathogenese geht man mittlerweile davon aus, dass es sich bei den Spindelzellen, die das Bild des KS im Spätstadium dominieren, um Endothelzellen handelt. Unklar ist allerdings immer noch, ob die infizierten Spindelzellen vom Lymphendothel, dem Blutendothel oder von beiden Endothelzelllinien abstammen (Wang 2004). Außerdem ist die Morphologie des KS heterolog. Neben den Spindelzellen befinden sich im KS auch andere Zellen. Einige davon sind mit HHV 8 infiziert, wie Gefäßendothelien, Lymphozyten und Monozyten, andere wiederum nicht-infiziert, wie Gefäßendothelzellen, Bindegewebszellen und verschiedene Leukozyten, insbesondere Monozyten, Mastzellen, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten (Staskus 1997, Blasig 1997, Ensoli 1998). Unklar ist, welche Rolle diese infizierten und nicht-infizierten Zellen in der formalen Pathogenese spielen.

Ebenfalls unklar ist die Dignität des KS. Ein eindeutiger Beleg für eine neoplastische Transformation ist bis dato nicht gefunden. Im Frühstadium handelt es sich beim KS unumstritten um eine reaktive Hyperplasie (Mesri 1999, Brooks 1986, Reitz 1999). Die meisten Studien, die sich mit der Dignität des KS beschäftigen, kommen zu dem Schluss, dass die Spindelzellen polyklonal sind, einige wenige haben Hinweise für monoklonale Eigenschaften (Roth 1992, Kaaya 1995, Rabkin 1997, Delabesse 1997, Gill 1998, Judde 2000).

3.1.1 Klinische Einteilung

Das Kaposi-Sarkom zeigt im Verlauf makroskopische Veränderungen, die bei dem KS der Haut und Schleimhäute eine klinische Einteilung erlauben. Das Anfangsstadium, auch „Patch-Stadium“ genannt, zeichnet sich durch blassrote bis livid-bräunliche Flecken aus, die dann in einem Übergangsstadium, dem „Plaque-Stadium“, teilweise konfluieren und Indurationen aufweisen. Im weiteren Verlauf finden sich Knoten, die eine derbe Konsistenz besitzen, häufig schmerzhaft sind und ulzerieren können. Letzteres wird klinisch als „Nodulär-Stadium“ bezeichnet. Des Weiteren können Ulzerationen, Atrophien und spontane Rückbildungen einzelner Effloreszenzen beobachtet werden.

3.1.2 Histopathologische Einteilung

Histopathologisch wird das KS in ein angiomatoides Frühstadium, eine Mischform und ein sarkomatoides, spindelzellreiches Spätstadium unterschieden.

Das **angiomatoide Frühstadium** zeigt typischerweise zahlreiche Gefäßproliferationen der oberen retikulären Dermis, die sich entlang der

Hautspalten, vorhandener Gefäße und anderer Strukturen der Dermis ausbilden (McNutt 1983, Chor 1992). Die neu geformten Gefäße sind meist kollabiert und irregulär geformt. Spindelzellen treten in diesem Stadium gar nicht oder nur vereinzelt auf. Außerdem finden sich ein entzündliches Infiltrat, extravasale Erythrozyten, Hämosiderin und Hyalin (Schwartz 1984, Chor 1992).

Im **sarkomatoiden Spätstadium** des KS wird das Bild von den Spindelzellen mit ausgeprägten faszikulären Formationen dominiert, die an ein differenziertes Fibrosarkom oder Leiomyosarkom erinnern. Außerdem können Plasmazellen und Hämosiderin nachgewiesen werden (Kao 1990). In diesem Stadium findet man auch sehr vereinzelt Mitosefiguren (Stickler 1991).

KS-Läsionen, die sowohl die typischen Charakteristika des Frühstadiums aufweisen als auch vermehrt Spindelzellen besitzen, werden als **Mischstadium** klassifiziert.

3.1.3 Dissemination des Kaposi-Sarkoms

Ein typisches Merkmal des KS ist sein multifokales Erscheinungsbild. Bisher ist noch unklar, ob diese Eigenschaft durch freie Virionen verursacht wird, die im Organismus zirkulieren und an anderen Stellen Zellen infizieren, oder sich infizierte Zellen aus dem Zellverband eines KS lösen und metastasierend in anderen Regionen absiedeln. Eine weitere Hypothese ist, dass infizierte Leukozyten für die Dissemination von HHV 8 verantwortlich sind (Blasig 1997, Ensoli 1998, Monini 1999).

3.1.4 Epidemiologische Formen des Kaposi-Sarkoms

Unter dem Namen Kaposi-Sarkom werden vier epidemiologische

Formen subsummiert, die ein identisches histologisches Erscheinungsbild aufweisen, sich aber in Progression, Risikofaktoren und dem Auftreten in unterschiedlichen Populationen unterscheiden. Zu ihnen gehören neben dem von Kaposi beschriebenen Klassischen KS, das Endemische, das Iatrogene und das Epidemische (HIV-assoziierte) KS.

3.1.4.1 Klassisches Kaposi-Sarkom

Das Klassische Kaposi-Sarkom betrifft vornehmlich ältere Männer zwischen dem 50. und dem 80. Lebensjahr. Der Altersgipfel liegt in der sechsten Dekade. Das Verhältnis zwischen Männern und Frauen liegt zwischen 11:1 (Reynolds 1965) und 15:1 (Oettle 1962). Ein erhöhtes Risiko liegt bei Süd-Ost-Europäern, mediterranen Populationen und aschkenasischen Juden vor (Franceschi 1995, Finlay 1979, Reynolds 1965).

Das Klassische KS zeichnet sich durch ein langsames Wachstum aus. Prädilektionsstelle des Klassischen KS ist die untere Extremität mit zentripetaler Ausbreitung im Verlauf (Kaposi 1872). Innere Organe werden selten befallen. Die mittlere Überlebenszeit beträgt 10 bis 15 Jahre, wobei die Todesursache von dem KS meist unabhängig ist (Horowitz 1984). Es weist eine gute Prognose auf (Orfanos, 1983). Sekundäre Malignome lassen sich in 35 % der Fälle verzeichnen, von denen die Hälfte auf hämatopoetischen Ursprung zurückzuführen ist (Safai 1980).

3.1.4.2 Endemisches Kaposi-Sarkom

Das Endemische Kaposi-Sarkom ist eine in Zentralafrika (vornehmlich

Sambia, Uganda und Ruanda) vorkommende Variante (Lothe 1963, Taylor 1971, Bayley 1984). In den Endemiegebieten macht das KS 9% aller Malignome aus. Die Altersverteilung ist zweigipflig. Betroffen sind meist männliche Erwachsene um das 40. Lebensjahr und Knaben (Lothe 1963). Beschrieben werden vier Subtypen des Endemischen KS mit unterschiedlicher Progredienz und Prognose. Im Kindesalter tritt gehäuft der aggressive lymphadenopathische Subtyp auf, der innerhalb von wenigen Jahren zum Tode führt (Athale 1995).

3.1.4.3 latrogenes Kaposi-Sarkom

Während einer Therapie mit Immunsuppressiva kann, insbesondere bei Organ-Transplantation und Kollagenosen, ein Kaposi-Sarkom auftreten. Der erste Fall eines latrogenen Kaposi-Sarkoms wurde 1969 nach einer Nierentransplantation beobachtet (Siegel 1969). Das Risiko, bei Nierentransplantation ein KS zu entwickeln, zeigt regionale Differenzen, die mit der Seroprävalenz von HHV 8 korrelieren und zwischen 0,4 und 0,9 % liegen (Harwood 1979, Parravicini 1997, Murray 2001, Farge 1999, Euvrard 2003). Die Populationen, die gehäuft von dem klassischen KS betroffen sind, haben bei immunsuppressiver Therapie auch ein erhöhtes Erkrankungs-Risiko (Shepherd 1997). Die Geschlechtsspezifität ist beim latrogenen KS weniger ausgeprägt als beim klassischen KS. Männer sind nur zwei- bis dreimal häufiger betroffen (Shmueli 1989). Die Unterbrechung der immunsuppressiven Therapie geht in der Regel mit einer Regression des KS einher, wobei meist eine weitere Therapie nicht notwendig ist (Penn 1983).

Die Mehrzahl der KS-Fälle nach Transplantation resultiert aus einer Reaktivierung des Virus in den Empfängern unter immunsuppressiver Therapie 90 % der Empfänger waren vor der Transplantation seropositiv

(Parravicini 1997, Farge 1999, Euvrard 2003). Es gibt aber auch Hinweise, dass HHV 8-infizierte Zellen des Spenders für die Transmission des latrogenen KS verantwortlich sind (Parravicini 1997). So konnten Barozzi et al. DNA des Y-Chromosoms in HHV 8-infizierten Zellen von weiblichen Organ-Empfängern nachweisen, deren Spender Männer waren (Barozzi 2003). Es wurde angenommen, dass freie Viren für die Transmission verantwortlich sind. Dem Nachweis von Barozzi et al. zufolge könnten auch HHV 8-infizierte Zellen an der Transmission beteiligt sein.

3.1.4.4 Epidemisches (AIDS-assoziiertes) Kaposi-Sarkom

Im Jahre 1981 wurde von Friedman-Kien et al. das bisher nur äußerst selten aufgetretene Kaposi-Sarkom bei über 50 jungen homosexuellen Männern beschrieben. Das KS konnte in dieser Gruppe in Haut und Schleimhäuten, Eingeweiden und Lymphknoten nachgewiesen werden (Friedman-Kien 1981). Es stellte sich heraus, dass das Kaposi-Sarkom eine assoziierte Erkrankung des bis dato noch unbekannten Acquired immune deficiency syndrome (AIDS) ist.

Das Risiko, ein KS zu entwickeln, ist für Patienten mit AIDS im Vergleich zur Normalpopulation schätzungsweise 20 000 Mal höher, das Risiko von HIV-positiven homosexuellen Patienten, ein KS zu entwickeln, liegt bei 20 %. Im Vergleich tritt es bei homosexuellen Männern mit AIDS 20 mal häufiger auf als bei hämophilen männlichen Patienten im gleichen AIDS-Stadium. Dies lässt vermuten, dass an der Ausbildung des Epidemischen KS ein sexuell übertragbares infektiöses Agens beteiligt ist (Beral 1990). Im Gegensatz zum Klassischen KS betrifft das Epidemische KS jede Altersgruppe, mit einem Altersdurchschnitt von 38 Jahren. Werden nur heterosexuelle KS-Patienten in die Studie

einbezogen, besteht eine gleiche Verteilung zwischen den Geschlechtern (Beral, 1990).

Die Prognose für das Epidemische KS ist individuell sehr variabel und hängt von dem Grad der Immundefizienz des Patienten ab. Das KS ist trotz einer Abnahme der Inzidenz durch die Einführung und Verbesserung der antiretroviralen Therapie, von 40 % im Jahre 1981 auf weniger als 20 % im Jahre 1992, noch immer der häufigste AIDS-assoziierte Tumor (Biggar 1996), wobei es heutzutage dank der Therapiemöglichkeiten, im Gegensatz zu anderen AIDS-assoziierten Tumoren, in der Regel keine primäre Todesursache mehr darstellt.

3.2 Humanes-Herpes-Virus 8 (HHV 8)

In den frühen 90er Jahren ließen epidemiologische Studien vermuten, dass das KS von HIV-infizierten Individuen durch ein sexuell übertragenes infektiöses Agens ausgelöst wird, was sich später als Humanes-Herpes-Virus 8 herausstellte (Beral 1990, Chang 1994). Unter homosexuellen Männern wird HHV 8 sexuell übertragen, bei heterosexuellen Individuen konnte dies nicht belegt werden (Kedes 1996b, Martin 1998, Blackbourn 1999, Melbye 1998, Smith 1999). Die hohe Seroprävalenz, die bei Kindern vor der sexuell aktiven Zeit in Endemiegebieten gefunden wurde, lässt auch auf Transmissionswege zwischen Mutter und Kind schließen, wobei die niedrige Seroprävalenz bei Kindern unter vier Jahren eine vertikale Transmission während der Schwangerschaft bzw. über die Muttermilch unwahrscheinlich macht (Plankoulaine 2000). Die Übertragung über den Speichel könnte relevant sein, weil HHV 8 aus dem Speichel isoliert werden kann (Koelle 1998, Blackbourn 1998, Viera 1997).

Nach der Entdeckung und Zuordnung des Humanen Herpesvirus 8

durch Chang und Moore (Chang 1994, Moore 1996) wurde das komplette Genom sequenziert (Russo 1996). Das Genom von HHV 8 besteht aus einer mehr als 140 kb langen „Long unique region“ (LUR), die zwischen je 800 bp langen „Terminal repeats“ (TR) liegt. Die LUR codiert für über 80 „Open reading frames“ (ORF), von denen 66 ORF's starke Homologien zum Herpes-Virus Samiri (HVS) besitzen. HHV 8 wurde einer Subfamilie der Gamma-Herpesviren, den Rhadinoviren zugeordnet.

3.3 Weitere HHV 8-assoziierte Erkrankungen

Neben dem Kaposi-Sarkom gibt es noch weitere Erkrankungen, die mit HHV 8 assoziiert sind. Hierzu gehören das sogenannte „Primäre Effusion Lymphom“ (PEL) und der multizentrische Typ des Morbus Castleman (MCD). Das PEL ist für die spätere Diskussion, insbesondere für den Vergleich des KS mit dem PEL, von Bedeutung und wird im Hinblick auf dessen molekulare Pathogenese ausführlich erläutert.

3.3.1 Primary Effusion Lymphoma (PEL)

Das PEL ist ein monoklonales Non-Hodgkin-B-Zell-Lymphom (Nador 1996, Cesarman 1995b). Die Zellen des PEL sind alle mit HHV 8 infiziert (Cesarman 1995a). Typisch für PEL-Zellen ist deren verminderte Expression von B-Zell-spezifischen Oberflächenantigenen (Boshoff 1998, Cesarman 1995b).

Im Gegensatz zu anderen Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) konnte das PEL bisher noch nicht mit einer klar definierten Dysfunktion eines molekularen Regelmechanismus assoziiert werden (Dalla-Favera 1999, Gaidano 2000). Andere aggressive B-Zell-Lymphome weisen

Translokationen in beispielsweise cMYC, BCL6 oder BCL2 auf, die zu charakteristischen klinisch pathognomonischen und pathologischen Eigenschaften der einzelnen NHL's führen (Carbone 1996, Cesarman 1995b, Gaidano 1999, Nador 1996). Bisher glückte nur der wiederholte Nachweis von Mutationen im BCL-6-Gen, die in 70 % der PEL-Fälle nachweisbar sind (Gaidano 1999). Die pathogenetische Relevanz dieser Mutationen ist allerdings unklar, weil das Protoonkogen BCL-6 im PEL gar nicht produziert wird (Carbone 1998). Gelegentlich werden im PEL Mutationen gefunden, die in der Onkogenese im Allgemeinen eine Rolle spielen könnten, wie zum Beispiel in p53, BAX, RAS (Nador 1996, Gaidano 2001, Gaidano 1997). Da diese Mutationen nur gelegentlich auftreten, ist anzunehmen, dass es sich um sekundäre Mutationen handelt, die für das PEL nicht pathognomonisch sind.

Numerische und strukturelle Veränderungen, wie Trisomie 12 oder 7 und chromosomale Aberrationen von Banden 1q21-25, konnten nachgewiesen werden (Gaidano 1999). Vermutlich beinhalten diese chromosomalen Orte für die Onkogenese des PEL verantwortliche Loci.

Der bisher fehlende Nachweis einer pathognomonischen Veränderung der zellulären DNA im PEL schließt deren Existenz nicht aus. Vielmehr lässt die beständige Monoklonalität des PEL (Nador 1996, Cesarman 1995) ein Zusammenspiel zwischen der viralen Infektion und genetischen Veränderungen vermuten, wie es bei anderen Virus-assoziierten Lymphomen, beispielsweise dem EBV-assoziierten Burkitt-Lymphom, der Fall ist (Klein 1994, Smith and Green 1991).

Ein Hinweis auf eine potentielle genetische Läsion, die für das PEL pathognomonisch sein könnte, ist die Störung in den Regelmechanismen der Cyklinkinase-Inhibitoren (CKI's), die in der Regulation des Zellzyklus eine zentrale Rolle spielen. Im Folgenden soll auf die Untersuchungen von drei CKI's (p16, p27 und p21) am PEL eingegangen werden.

Für den CKI p16 konnte gezeigt werden, dass er in den meisten PEL-Zelllinien nicht nachweisbar ist. In einigen wurden Deletionen des p16-Gens nachgewiesen (Platt 2002). Experimente, bei denen eine ektope Expression von p16 durchgeführt wurde, führten zum Zyklusarrest in der G1-Phase (Platt 2002). Das Ausschalten von p16 ist demnach für die Pathogenese des PEL von Bedeutung.

Im Gegensatz zu p16 wird der Cyklinkinase-Inhibitor p27, der unter anderem für die Differenzierung von B-Zellen von Bedeutung ist (Schwartz 2000), im PEL stark exprimiert (Carbone 2000), obwohl diese Zellen proliferieren, wie es unter anderem der Nachweis von Ki67 zeigt (Carbone 2000). Normalerweise ist in ruhenden Zellen der p27-Spiegel hoch, während des Zellzyklus ist er stark reduziert (Sherr 1996). Es konnte aber nachgewiesen werden, dass das virale Cyclin (vCyc) von HHV 8 an p27 bindet und dessen Funktion hemmt (Jarviluoma 2004). Für die Funktionslosigkeit von p27 gibt es Analogien zu anderen aggressiven B-Zell-Lymphomen, die trotz übermäßiger Proliferation den CKI stark exprimieren (Sanchez-Beato 1999).

Der CKI p21, der in dieser Arbeit am KS untersucht wird, ist wiederum im PEL nur geringfügig exprimiert. Die Induktion der p21-Expression ist jedoch im PEL mit dem Phorbol-Ester TPA (12-O-Tetradecanoyl Phorbol-13-Acetat) möglich (Wu 2002). Dieser Effekt dient als experimentelle Simulation des Wechels von der latenten zu lytischen Phase der viralen Replikation (Renne 1996). P21 ist in den induzierten Zellen auch funktionsfähig. So konnte nachgewiesen werden, dass in der lytischen Phase der p21-Promotor über das virale Protein RAP zusammen mit C/EBP α zu einem Zyklusarrest durch die Expression von p21 führt (Wu 2002).

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass ähnliche Dysfunktionen der CKI's im Burkitt-Lymphoma (BL) bekannt sind. Das BL ist mit dem

Epstein-Barr-Virus (EBV) assoziiert, einem nahen Verwandten von HHV 8. Die CKI's p16, p21, p27 und p57 werden in BL-Zellen nur geringfügig produziert oder sie sind nicht nachweisbar (Pajic 2000). Auch im BL führt eine experimentell durchgeführte Produktion von p16 zu einem Zyklusarrest der Zellen (Pajic 2000). Auch im BL kann über den Einfluss eines viralen Proteins, des ZTA, mit C/EBP α ein p21-abhängiger Zyklusarrest herbeigeführt werden (Cayrol 1996, Wu 2003). Demnach ist die Dysfunktion der CKI's, die einerseits durch virale Proteine verursacht wird und andererseits in genetischen Mutationen begründet liegt, in der Pathogenese des PEL von wesentlicher Bedeutung.

Aus den oben genannten Überlegungen lässt sich annehmen, dass das PEL auf der Basis einer multifaktoriellen Genese entsteht. HHV 8 ist wahrscheinlich ein essentieller Faktor. Mutationen, die zu Dysfunktionen von Tumor-Suppressoren wie den CKI's führen, scheinen daneben wichtige Co-Faktoren darzustellen.

3.3.2 Multizentrischer Typ des Morbus Castleman

Eine Besonderheit des Multizentrischen Typs des Morbus Castleman (MCD) sei hier erwähnt, weil sie für das Verständnis der Pathogenese des KS von Bedeutung ist. Es handelt sich bei dem MCD, im Gegensatz zum PEL, nicht um einen monoklonalen Tumor, sondern um eine lymphoproliferative Funktionsstörung, deren Zellen zum überwiegenden Teil nicht mit HHV 8 infiziert sind. Die Ursache der lymphoproliferativen Dysfunktion ist jedoch in einer kleinen Subpopulation von HHV 8-infizierten Zellen begründet, die parakrine Faktoren produzieren, welche B-Zellen stimulieren und zur Proliferation anregen (Parravicini 1997, Dupin 1999, Katano 2000). Zu diesen Faktoren zählen unter anderem vIL 6, vMIP's und vGPCR. Der stimulierende Einfluss dieser Faktoren

auf die Umgebung spielt nicht nur beim MCD, sondern auch in der Pathogenese des KS eine zentrale Rolle.

3.4 Gemeinsame Eigenschaften der Herpesviren

Herpesviren teilen einige biologische Eigenschaften, die zum Verständnis der Pathogenese von Herpesvirusinfektionen im Allgemeinen wichtig sind. Der Pathomechanismus variiert zwischen den einzelnen Herpesviren. Im Folgenden soll kurz auf die für die Arbeit relevanten allgemeinen Eigenschaften der Herpesviren eingegangen werden, bevor die speziellen Eigenschaften von Proteinen des HHV 8 dargestellt werden.

Bei Herpesviren handelt es sich um große lineare doppelsträngige DNA-Viren, von denen bisher neun humane Viren bekannt sind (HSV 1, HSV 2, HCMV, VZV, EBV, HHV 6a, HHV 6b, HHV 7, HHV 8/KSHV).

Herpesviren besitzen eine große Anzahl von Proteinen, die für den Nukleinsäuremetabolismus, die DNA-Synthese und für posttranskriptionale Modifikationen zuständig sind. Hierzu gehören unter anderem Ribonucleotid-Reduktase, Dihydrofolat-Reduktase, Thymidin-Kinase, Thymidylat-Synthetase, DNA-Polymerase, Helicase, Primase und Protein-Kinase. Damit haben Herpesviren die Fähigkeit der eigenständigen DNA-Replikation.

Während der Produktion von Virionen in großer Menge kommt es zur Destruktion der Wirtszellen, der sogenannten Lyse. Vor der Lyse findet eine virale Replikation des zirkulären Episoms statt. Diese Replikation läuft in einem sogenannten „Rolling circle“-Mechanismus ab, bei dem permanent Kopien des zirkulären Episoms gebildet werden. Anschließend werden die einzelnen Virionen als lineare DNA in die Capside verpackt und durch die Lyse der Wirtszelle freigegeben.

Die DNA-Synthese und die Capsid-Zusammensetzung finden im Nukleus der Wirtszelle statt. Aus diesem Grund kommt es bevorzugt bei Herpesvirusinfektionen zu Veränderungen im Wirtszellchromosom und zu DNA-Schäden. Dies führt zu einer p53-abhängigen Induktion von p21, eine Reaktion der Wirtszelle, die durch den Zyklusarrest die virale Replikation verhindern soll (Feng 2004).

Die Gen-Expression ist bei Herpesviren streng reguliert. Es besteht eine koordinierte Regulation einzelner Proteingruppen, deren Expression über gleiche Signale erfolgt. Grob werden die Proteine nach ihrem Expressionszeitpunkt in „immediate early“, „early“ und „late Proteins“ eingeteilt.

Die viralen Proteine sind häufig multifunktional. Außerdem können viele virale Proteine posttranskriptional modifiziert werden und unterliegen somit gewissen regulatorischen Einflüssen.

Neben der lytischen Phase können Herpesviren in Zellen in einer latenten Phase „verweilen“, die mit einer Expression von nur wenigen Genen auskommt. In der latenten Phase bedienen sich Herpesviren im Gegensatz zur lytischen Phase zellulärer Replikationsmechanismen, indem sie sich der Wirtszellreplikation anschließen.

Die Einteilung in die latente und lytische Phase ist als Modell zu sehen, das der Vereinfachung und Erklärung bestimmter Sachverhalte dient. Andere Sachverhalte können damit nicht erklärt werden. So können Herpesviren zu unterschiedlichen Mustern der Gen-Expressionen führen, die durch andere Faktoren, unabhängig von der jeweiligen Replikationsphase, bestimmt werden. Ein Faktor ist die Art der infizierten Wirtszelle. Beispielsweise wird das virale Protein LANA2 nur in der latenten Phase von B-Zellen, nicht aber im KS exprimiert (Rivas 2001). Des Weiteren werden Unterschiede im Expressionsmuster durch den

Einfluss von exogenen Faktoren bestimmt. So kann vIL 6, das als „immediate early Protein“ typischerweise zu einem sehr frühen Zeitpunkt der viralen Replikation produziert wird, auch unabhängig von der Replikationsphase durch Interferon (IFN) verstärkt exprimiert werden (Chatterjee 2002). Die oben genannten Faktoren legen nahe, warum unterschiedliche Funktionsstörungen in unterschiedlichen Zellen oder Geweben beobachtet werden. Außerdem kann nicht von *einer* latenten Phase gesprochen werden. Das dichotome Modell der Einteilung von latenter und lytischer Phase wird demzufolge immer mehr verlassen, da es zur Ergründung der Pathogenese von Herpesvirus-assoziierten Läsionen nicht ausreicht (speziell für HHV 8 siehe: Bais 1998, Yang 2000).

Einige Herpesviren haben transformierende Eigenschaften. Gut erforscht ist dies für das Epstein-Barr-Virus (EBV), ein weiterer Vertreter der humanen Gamma-Herpesviren, zu denen auch HHV 8 gehört. Andere nahe Verwandte von HHV 8 besitzen ebenfalls transformierende Eigenschaften. Zu ihnen gehören neben vielen anderen das Herpes-Virus Samiri (HVS) und das Murine-Herpes-Virus 68 (MHV 68) (Virgin 1997; Reviewed in Fields Virology 2001).

Die latente Phase der viralen Replikation wurde bei virusassoziierten Tumoren ursprünglich als die Phase angesehen, in der die Ursache der Onkogenese zu sehen ist, während man annahm, dass die lytische Phase, durch den daraus folgenden Zelluntergang dem Wachstum entgegenwirkt. Inzwischen wird immer mehr angezweifelt, dass diese Annahme die virale Onkogenese erklären kann, weil Prozesse, die in den lytischen Zellen vonstatten gehen, über parakrine Mechanismen einen zentralen Stellenwert in der Pathogenese und Replikation anderer Zellen haben (Bais 1998, Yang 2000).

Herpesviren besitzen die Eigenschaft, zelluläre DNA in das virale Genom

zu integrieren. Dieser Vorgang wird *molecular piracy* genannt. Aus diesem Grund zeigen viele virale Gene zelluläre Homologien. Wie diese Integration abläuft ist bisher noch unbekannt (Choi 2001).

3.5 Proteine von HHV 8 und deren Eigenschaften

Im Folgenden soll auf bestimmte Proteine von HHV 8 eingegangen werden, die in dieser Arbeit behandelt werden. Sie werden nach ihrem unterschiedlichem Expressionszeitpunkt klassifiziert. Demnach gibt es Proteine, die nur in der lytischen Phase produziert werden, sowie andere, die in beiden Phasen vorliegen und für die latente Phase typisch sind. Wie bei allen Herpesviren werden auch bei HHV 8 in der latenten Phase der viralen Replikation nur wenige Proteine produziert (Staskus 1997, Zhong 1996). Zu ihnen gehören LANA, vCyc, vFLIP und Kaposin/K12. Ein weiteres Protein, LANA-2/K10.5, ist für die latente Phase von infizierten B-Zellen spezifisch (Moore 1996, Zhong 1996, Rainbow 1997, Sarid 1998, Stürzl 1999, Dupin 1999, Paravicini 2000, Rivas 2001). Eine kurze Zusammenfassung ist aus der folgenden Tabelle zu entnehmen. Für vertiefende Ausführungen, bezüglich weiterer Proteine von HHV 8, wird auf das Review von Moore 2003 verwiesen.

HHV 8 Proteine	HHV 8 Gen	Eigenschaften und Funktion
der latenten Phase		
LANA (latent)	ORF73	Interaktion mit p53; Interagiert mit der hypophosphorylierten Form des Rb; bindet an MNDA; Persistenz des viralen Episoms durch Bindung an ori-P und Histon H1; Expression in allen HHV 8 infizierten Zellen; interagiert mit RING3
vCyc (latent)	ORF72	Assoziiert mit cdk6/cdk4 phosphoryliert es Rb und Histon H1; Resistent gegenüber CKI's (p16, p21, p27); phosphoryliert p27 (führt zum Abbau); posttranskriptionale Modifikation und Aktivierung durch CAK
vFLIP (latent)	Orf K13	Homolog des zellulären Apoptoseinhibitors (FLIP); Transkript von LT 1 und LT 2; posttranskriptionale Regulation der Protein-Expression in vivo
LANA-2 (latent)	ORF10.5	Inhibiert p53-abhängige Transkription in hämatopoetischen Zellen; keine Expression im KS
HHV 8 Proteine	HHV 8 Gen	Eigenschaften und Funktion
der lytischen Phase		
vIL6 (lytisch)	ORF K2	B-Zell- Proliferationsfaktor ; verhindert Apoptose in IL 6-abhängigen Plasmazytom-Zellen; bindet an die gp130-Untereinheit, benötigt nicht die gp80-Untereinheit des IL6-Rezeptors; induziert Angiogenese und VEGF in Rattenfibroblasten; verhindert IFN-Induktion von p21; Expression nur in einem geringen Anteil von infizierten hämatopoetischen Zellen, im KS geringe Expression
vIRF (lytisch)	OFR K9	Inhibiert IFN-Signaltransduktion; bildet CBP/p300; transformiert Rattenfibroblasten; Proteinexpression in MCD und PEL-Zelllinien, nicht in KS und PEL
vBcl-2 (lytisch)	OFR16	Homolog des zellulären BCL-2; inhibiert BAX-abhängige Apoptose
vGPCR (lytisch)	ORF74	Chemokinrezeptor-Homolog; induziert Transformation, Angiogenese und VEGF in Rattenfibroblasten; Signaltransduktion: G-Proteine gekoppelt, JNK/SapK, p38/HOG; Signaltransduktion wird durch IP-10 und vMIP-II inhibiert
vMIP-I	ORF K6	Alle MIP's: Interaktion mit Chemokinrezeptoren (CCR); Induktion von Angiogenese in ovo; selektive Induktion von Chemotaxis (z.B. Th2), Inhibition der Chemotaxis für andere Zellen
vMIP-II	ORF K4	
vMIP-III (lytisch)	ORF K4.1	
K-bZIP/RAP (lytisch)	ORF K8	Inhibition der G2/M Transition

Tabelle 1: Eigenschaften von HHV 8 Proteinen der latenten und der lytischen Phase (modifiziert nach Moore PS, 2003)

3.5.1 LANA: Funktion und Regulation

LANA (ORF73) wurde 1997 identifiziert (Kedes 1997). Von den Proteinen, die in der latenten Phase produziert werden, ist LANA das einzige, bei dem die mRNA mittels In-situ-Hybridisierung (mRNA-Nachweis) und das Protein mittels der Immunhistochemie gut nachweisbar ist (Kedes 1997, Kellam 1997, Rainbow 1997, Dupin 1999, Stürzl 1999, eigene Daten).

LANA wird in allen HHV 8 infizierten Zellen produziert. Ein Großteil der KS-Spindelzellen (>90 %) und alle PEL-Zellen sind LANA-positiv (Schulz 2001). Dabei kann LANA sowohl in latenten Zellen des PEL, als auch in TPA-induzierten lytischen Zellen von PEL-Zelllinien nachgewiesen werden (Katano 2000). Aus diesem Grund eignet sich LANA als serologischer Marker für HHV-8-infizierte Zellen. Unter dem Mikroskop zeigt sich eine charakteristische granuläre Anfärbung im Zellkern, der die Akkumulation von LANA mit Heterochromatin zugrunde liegt (Stekely 1999).

LANA stellt ein multifunktionales virales Protein dar. Es interagiert mit Schlüsselproteinen des Zellzyklus und der Apoptose. Außerdem besitzt LANA sowohl aktivierende als auch inhibierende Eigenschaften auf Promotoren, beeinflusst die IFN-Signalübertragungswege und ist für die Persistenz des Episoms während der Zellteilung notwendig. Im folgenden sollen die bekannten Eigenschaften dieses Proteins ausführlich erläutert werden.

3.5.1.1 Interaktion von LANA mit Schlüsselproteinen von Apoptose und Zellzyklus

LANA interagiert mit p53 und dem Retinoblastoma Protein (Rb). Es handelt sich um Schlüsselproteine der Apoptose und des Zellzyklus.

Diese Eigenschaft konnte für mehrere Onkovirus-Proteine (E6 und E7 des HPV; T-Antigen des SV-40, E1a des Adenovirus) nachgewiesen werden (Butel 2000). Andere Herpesviren kodieren ebenso für Proteine, die mit p53 und Rb interagieren. Der lytische Transaktivator Zta von EBV interagiert mit p53 (Zacny 1998). Das virale Protein Rta interagiert mit Rb. Das CMV-codierte „immediate-early Protein“ IE2 interagiert sowohl mit p53, als auch mit Rb (Hagemeier 1994). Das HSV-Protein ICP0 kann p53 induzieren (Flemington 2001).

Die Interaktion von LANA mit p53 konnte durch Experimente an PEL-Zelllinien gezeigt werden (Friborg 2000). Diese Interaktion scheint p53 in dessen transkriptioneller Aktivität zu hemmen und die p53-abhängige Apoptose verhindern zu können (Friborg 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von LANA an p53 keinen Einfluss auf die DNA-Bindungseigenschaften von p53 hat und auch nicht zu einem Abbau von p53 führt (Friborg 2000), wie es beispielsweise für das Protein E6 des HPV gezeigt werden konnte (Werness 1990; Scheffner 1990).

Die Interaktion von LANA mit der hypophosphorylierten Form des Retinoblastoma Protein (Rb) konnte an HHV 8-infizierten B-Zelllinien gezeigt werden (Radkov 2000). Es ist noch nicht geklärt, welchen Einfluss die Bindung von LANA an Rb im KS haben könnte. Bisher konnte nicht nachgewiesen werden, dass LANA alleine zelltransformierende Eigenschaften besitzt. Die fragliche Einflussnahme von LANA auf die Zelltransformation soll unter dem nachfolgendem Kapitel 3.5.1.4 diskutiert werden.

3.5.1.2 Interaktion von LANA mit weiteren Proteinen

Es konnte gezeigt werden, dass LANA mit diversen anderen Proteinen

interagiert. Hierzu gehören RING3, MNDA und Histon H1.

Für RING3 konnte gezeigt werden, dass es indirekt die Phosphorylierung von LANA an bestimmter Stelle induzieren kann und somit LANA posttranskriptional modifiziert (Platt 1999).

Das „Human myeloid cell nuclear differentiation antigene“ (MNDA) gehört zu der Familie der hämatopoetischen Interferon-induzierbaren Proteine. Bisher ist noch nicht geklärt, welche Funktion die Interaktion von LANA mit MNDA haben könnte (Fukushi 2003).

LANA verankert virale Episome von HHV 8 an das Wirtszellchromatin über dessen Bindung mit Histon H1 in der Interphase und der Mitose (Szekely 1999, Ballestas 1999, Cotter 1999). Es konnte gezeigt werden, dass diese Bindungseigenschaften notwendig und suffizient für die Persistenz des Episoms in den Tochterzellen ist (Ballestas 1999).

3.5.1.3 LANA besitzt eine regulatorische Funktion an zellulären und viralen Promotoren

Ein vielfältiger Einfluss von LANA auf die Transkription konnte nachgewiesen werden. LANA hat auf die Gene, die in der latenten Phase aktiv sind (LANA, vCYC, vFLIP) und auf einige „IFN-responsive cellular genes“ einen stimulierenden Effekt. Auf andere Promotoren, beispielsweise die „Long terminal repeats“ von HIV und NFκB-abhängigen Reportergenen hat LANA einen inhibierenden Effekt (Renne 2001).

3.5.1.4 LANA führt durch die Interaktion mit Rb nicht zur Zelltransformation

LANA wird in einem Großteil der Spindelzellen des KS exprimiert und

kann in nahezu allen HHV 8-infizierten Zellen nachgewiesen werden. Diesem viralen Protein wird eine Schlüsselrolle bei der Inhibition der Apoptose und der Regulation des Zellzyklus eingeräumt. Eine Interaktion von LANA mit p53 (Friborg 2000) und der hypophosphorylierten Form des Retinoblastoma-Proteins (Rb) (Radkov 2000) konnte zwar gezeigt werden, der Beweis, dass LANA eine transformierende Wirkung besitzt, konnte bisher nicht erbracht werden. Andere DNA-Tumroviren, deren Proteine mit p53 und Rb interagieren, zeigen transformierende Eigenschaften (Butel 2000, s.409ff). Als Beispiel sei hier das T-Antigen von SV40 genannt, das ebenfalls mit p53 und Rb interagiert und eine transformierende Wirkung auf die Zelle hat (Conzen 1994). Im Folgenden werden die Experimente von Radkov et al. erläutert, um darzustellen, dass LANA durch die Interaktion mit Rb die Zelle nicht aktiviert.

In einem Experiment konnten Radkov et al. zeigen, dass LANA alleine in primären Rattenembryo-Fibroblasten keine Zelltransformation bewirkt. Zusammen mit dem Proto-Onkogen HRas, das zu einer Hyperphosphorylierung von Rb führt, kann dagegen eine Zelltransformation induziert werden (Radkov 2000). In einem anderen Experiment gelingt die Aktivierung eines E2F-Promotors durch LANA nur in der Zelllinie DG-75, die mit LANA und einem artifiziellen E2F-Promotor kotransfiziert ist (Radkov 2000). Die DG-75-Zelllinie stammt von dem Burkitt-Lymphom (BL) ab und besitzt die typische Translokation t (8;14) des BL, wodurch das Proto-Onkogen c-myc vermehrt exprimiert wird (Ben-Bassat 1977). Myc ist ein potenter Aktivator des Zellzyklus, der über die Expression von Cyclin D2, Cyclin E und Cdk4 zu einer Hyperphosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins führt (Pajic 2000). Demnach zeigt sich auch hier, dass nur durch einen mitogenen Stimulus, der das Retinoblastoma-Protein phosphorylieren kann, eine Aktivierung

des Zellzyklus zu Folge hat.

Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass LANA durch die Interaktion mit Rb die Zelle nicht aktiviert. Aus den Ergebnissen von Radkov geht hervor, dass die Zelltransformation einen mitogenen Stimulus wie HRas oder c-myc benötigt, der zu einer Hyperphosphorylierung von Rb führt. Da LANA an hyperphosphoryliertem Rb nicht bindet, geht dies mit der Dissotiation von LANA und Rb einher. Somit kann die Interaktion von LANA mit Rb nicht zur Aktivierung der Zelle führen. Vielmehr wäre denkbar, dass die Dissotiation von LANA von Rb eine Aktivierung der Zelle zu Folge hat und LANA durch die Bindung mit Rb eine regulative oder sogar hemmende Wirkung auf den Zellzyklus ausübt.

3.5.2 Virales Cyclin (vCYC; ORF 72)

Das virale Cyclin ist ein Cyclinhomolog, das mit dem zellulären Cyclin D2 in 53 % übereinstimmt (Li 1997). Zelluläre Cycline bilden die regulative Untereinheit von Komplexen, deren katalytische Untereinheit Cyclin-abhängige Kinasen (Cdk's) darstellen. Die Komplexe regeln den (zeitlich) korrekten Ablauf des Zellzyklus. Sie können von Cyclinkinase-Inhibitoren (CKI's) inaktiviert werden (Sherr 1996).

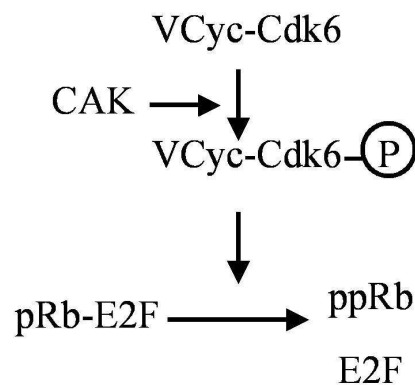
Das vCyc gehört zu den in der latenten Phase exprimierten Proteinen (Chang 1996, Li 1997, Goddon-Kent 1997, Stürzl 1999, Dupin 1999). Die Transkriptionsprodukte konnten im Gewebe nachgewiesen werden, das Protein hingegen ist im Gewebe nicht nachweisbar (Cannell 1999). Es bildet vorzüglich mit Cdk6 einen Komplex, der das Retinoblastoma-Protein (Rb) phosphorylieren kann (Chang 1996, Godden-Kent 1997). Außerdem kann der Komplex verschiedene andere Proteine phosphorylieren, die nicht zu den Substraten des zellulären Cyclin-D-cdk-6 Komplexes gehören. Dazu gehören der CKI p27, Histon H1, Id-2

und cdc25. Die genannten Proteine werden in nicht-infizierten Zellen von dem Cyclin-E-cdk2-Komplex phosphoryliert (Godden-Kent 1997, Ellis 1999, Mann 1999, Jarviluoma 2004). Somit spielt der Komplex von vCyc und cdk6 auch in der S-Phase eine Rolle.

Das Protein vCyc scheint von Cyclinkinase-Inhibitoren (CKI's) nicht in dem Maße gehemmt zu werden, wie es bei dessen zellulären Homologen der Fall ist. Es konnte gezeigt werden, dass vCyc gegenüber den CKI's p16, p21 und p27 sehr resistent ist (Swanton 1997). Außerdem kann der vCyc-Cdk6-Komplex an p27 binden (Jarviluoma 2004), diesen phosphorylieren, destabilisieren und somit degradieren (Ellis 1997, Mann 1999).

Die Untersuchung der Bedeutung von vCyc auf die Zellzykluskontrolle ist problematisch, weil Zelllinien, die mit vCyc transfiziert sind, in Apoptose gehen (Ojala 1999, Ojala 2000) und vCyc alleine in Transformationsassays wie Immortalisierung oder der sogenannten Fokus-Formation (*engl.*: focus formation) keinen Effekt zeigen (Cannell 1999).

Neben der Funktion von vCyc in der Transition von G0/G1, scheint es auch in der Überschreitung von G1/S eine Rolle zu spielen. Unter Zugabe von vCyc-Cdk6 kommt es in isolierten Zellkernen der späten G1-Phase zur DNA-Replikation (Laman 2001). Außerdem führt eine ektope Expression von vCyc in ruhenden Zellen zum Eintritt in die S-Phase (Swanton 1997).



Trotz dieser onkogenen Eigenschaften ist die Progression des Zellzyklus von endogenen Mechanismen des Wirtszellzyklus abhängig, auch wenn vCyc zum Abbau von p27 führt (Ellis 1999, Mann 1999). So konnte gezeigt werden, dass vCyc durch zelluläre Faktoren reguliert wird. Der Eintritt in die S-Phase durch vCyc-Cdk-6 kann nur unter Phosphorylierung des Komplexes durch die cyclin-aktivierende Kinase (CAK) vonstatten gehen (Jeffrey 2000, Kaldis 2001, Child 2001). Folglich kann vCyc nur unter der Mitwirkung von zellulären Cdk's zu einer kompletten G1-S-Progression führen.

Neben diesen onkogenen Einflüssen kommt es durch vCyc gleichzeitig zur Aktivierung von Zyklusarrest und Apoptose (Ojala 1999, Ojala 2000, Verschuren 2002). Die Expression von vCyc in p53^{-/-}-Knockout-Mäusen führt zu Lymphomen (Verschuren 2002). Dieser Effekt scheint in der Dysfunktion des Feedback-Mechanismus, der über p14, MDM2 und p53 läuft, begründet zu sein (Verschuren 2004). Zusammenfassend scheint das virale Cyclin für die Zyklusregulation eine Rolle zu spielen. Es unterliegt aber zellulären Regulationen und führt somit nicht zu einem autonom ablaufenden Zellzyklus. Es hängt von diversen Faktoren ab, unter welchen Bedingungen die Überschreitung des Restriktionspunktes vonstatten geht. Diese Hypothese der „viralen Zellzykluskontrolle“ soll in der Diskussion ausführlich unter Berücksichtigung des derzeitigen Stands der Forschung und der hier ermittelten Ergebnisse abgehandelt

werden.

3.5.3 Virales Interleukin-6 (vIL 6; ORF K2)

Das virale Interleukin-6 (vIL 6) ist ein Homolog des humanen Interleukin-6 (hIL 6). Das hIL 6 ist unter anderem in der B-Zell-Differenzierung notwendig. Des Weiteren stellt es einen wichtigen Wachstumsfaktor für bestimmte Tumore dar, beispielsweise für Multiple Myelome, Lymphome und Leukämien (Klein 1989, Keller 1996, Simpson 1997, Tupitsyn 1998).

Das vIL 6 gehört zu den Proteinen, die in der frühen lytischen Phase produziert werden. Es kann allerdings auch über Interferon (IFN), unabhängig von der Phase der viralen Replikation, induziert werden (Chatterjee 2002).

Es wird in einigen PEL-Zelllinien beständig in den latenten und den lytischen Zellen exprimiert, in anderen nur in den lytischen Zellen (Nicholas 1997, Moore 1996). Im KS wird vIL 6 nur in einer geringen Subpopulation von Zellen exprimiert (Parravicini 2000, Brousset 2001). Im Multizentrischen Castleman (MCD) hingegen wird vIL 6 stark exprimiert. Für das MCD ist vIL 6 ein essentieller Faktor (Parravicini 2000, Aoki 1999).

Funktionelle Analysen konnten zeigen, dass vIL 6 durch die Bindung an gp130 den Signaltransduktionsweg über die JAK-Kinase und MAPK aktivieren kann und somit die Apoptose der virusinfizierten Zelle verhindert (Molden 1997, Osborne 1999, Hideshima 2000). Im Gegensatz zum humanen IL 6, das die beiden Untereinheiten gp80 und gp130 des IL-6-Rezeptors benötigt, um den Transduktionsweg zu aktivieren, genügt vIL 6 die Interaktion mit gp130 (Molden 1997, Hoischen 2000). Durch diese Interaktion wird die IFN-bedingte Induktion von p21, die mit einem Zyklusarrest einhergehen würde, verhindert. Da

IFN wiederum gp80 herabreguliert, kann das humane IL 6 nicht interagieren (Chatterjee 2002). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass vIL 6 und hIL 10, jedoch nicht das humane IL 6 für PEL-Zelllinien essentiell sind. Ohne diese beiden Faktoren hören die Zellen auf, sich zu teilen und gehen in Apoptose (Jones KD. 1999).

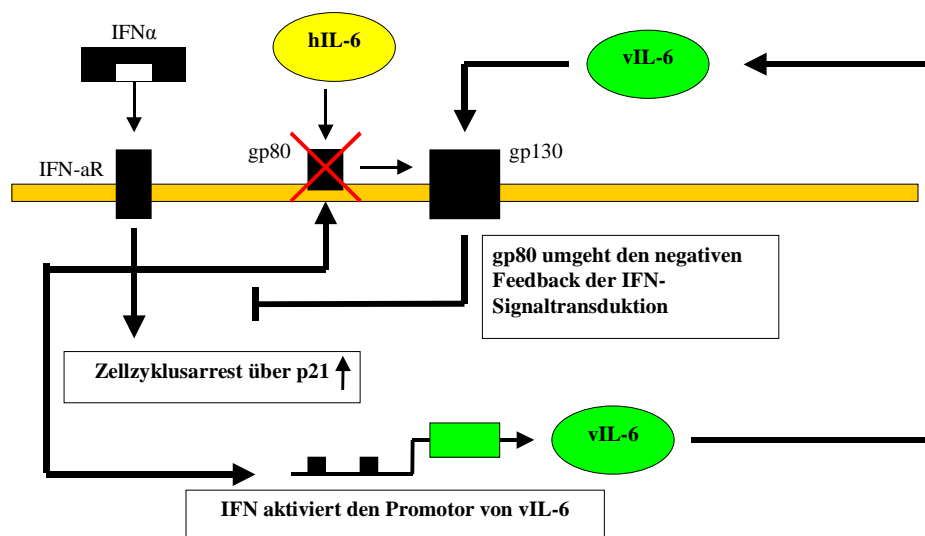


Abbildung 1: Im Gegensatz zum humanen IL6 (hIL6) benötigt das virale IL6 (vIL6) nur gp130 für die Hemmung des IFNα-abhängigen Zyklusarrest, der durch p21 induziert wird. Somit kann vIL6 trotz der Hemmung der Expression von gp80 durch IFNα den IFNα-abhängigen Zyklusarrest verhindern. Außerdem aktiviert IFNα den Promotor von vIL6 (modifiziert aus Chatterjee 2002).

Die funktionellen Eigenschaften von vIL 6 zeigen, dass es über parakrine Mechanismen einen p21-abhängigen Zyklusarrest verhindern kann. Dies könnte ein Pathomechanismus sein, durch den der interferonabhängige Zyklusarrest umgangen werden kann (Abbildung 1). Der Einfluss von IFN ist ein wichtiger Abwehrmechanismus gegenüber Virusinfektionen. Möglicherweise ist der parakrine Einfluss von vIL 6 für die Transformation von infizierten und nicht-infizierten Zellen des KS wichtig. Im folgenden Schema wird der Einfluss von vIL 6 auf den IFN-Signaltransduktionsweg verbildlicht.

3.5.4 Viraler G-Protein-gekoppelter Rezeptor (vGPCR; ORF 74)

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR's) bestehen aus sieben transmembranen α -Helices, die über extra- und intrazelluläre Peptidschleifen miteinander verbunden sind (Schöneberg 1999). Die Interaktion des Rezeptors mit diversen Agonisten führt zu einer reversiblen Aktivierung von heterotrimären G-Proteinen, wodurch es zu einer Signaltransduktion mit Aktivierung von Enzymen und Ionenkanälen kommt (Alberts 1994).

Das virale GPCR ist ein Homolog des Interleukin-8-Rezeptors (IL-8R) (Cesarman 1996, Neipel 1997, Russo 1996). Es wird in der frühen lytischen Phase der viralen Replikation exprimiert und kann nur in einer geringen Subpopulation der Zellen des KS und des PEL nachgewiesen werden (Kirshner 1999, Dittmer 1998, Sun 1999).

Neben IL 8 können eine Vielzahl von Cytokinen an vGPCR binden (Arvanitakis 1997, Cesarman 2000, Ho 1999). Außerdem führt vGPCR auch ohne den Einfluss der Agonisten zu einer Signaltransduktion (Arvanitakis 1997, Bais 1998).

Die ektope Expression von vGPCR führt zu Proliferation und Angiogenese (Arvanitakis 1997, Bais 1998). Die Angiogenese, die durch vGPCR induziert wird, kommt unter anderem durch die parakrine Wirkung des VEGF zustande (Bais 1998), der im KS einen wichtigen autokrinen Wachstumsfaktor darstellt (Masood 1997).

Da transgene vGPCR-Mäuse KS-ähnliche Läsionen aufweisen (Yang 2000), wird angenommen, dass der mitogene Stimulus, der von dem parakrinen Effekt des vGPCR ausgeht, für die Pathogenese des KS notwendig ist (Kirshner 1999).

3.5.5 Virale macrophage inflammatory Proteins (vMIP I-III; ORF K4, K4.1, K6)

Die viralen MIP's zeigen Homologien zum zellulären „Makrophagen Inflammatory Protein- α “ (MIP-I α) (Nicholas 1997). MIP-I α ist ein Chemokin. Chemokine besitzen auf Leukozyten einen chemoattraktiven Effekt. Sie interagieren mit G-Protein-gekoppelten Chemokin-Rezeptoren (CCR's). Folge ist die Migration der Leukozyten aus den Blutgefäßen in das Gewebe (Taub 1996, Adams 1997, Murdoch 2000). Viele Herpesviren besitzen Chemokin-Gene in der DNA (Christopher 2000).

Das virale MIP-II scheint ein Chemokin-Antagonist zu sein, weil es den chemoattraktiven Effekt von Chemokinen in vitro inhibiert und die Infiltration von Leukozyten reduziert (Kledal 1997, Chen 1998). VMIP-III ist ein Chemokin-Agonist. Es führt zu einer selektiven Migration von TH2-Zellen (Stine 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die vMIP's Angiogenese in ovo induzieren (Boshoff 1997).

Die Eigenschaften der vMIP's zeigen, dass sie neben der selektiven Chemotaxis einen wichtigen parakrinen mitogenen Stimulus im KS darstellen können.

3.6 Funktion und Regulation von Zykluskontrollproteinen

3.6.1 Ki67: Funktion und Regulation

Ki67 ist ein Protein, dessen Vorhandensein für die Proliferation einer Zelle eine notwendige Voraussetzung ist (Gerdes 1992). Die Expression von Ki67 beginnt in der zweiten Hälfte der G₁-Phase, nimmt in der S-Phase und G₂-Phase zu, erreicht das Maximum in der Mitose (Gerdes

1984) und wird mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 1$ h wieder abgebaut (Bruno 1992). Aus diesem Grund eignet sich Ki67 als Marker für Zellen, die sich in einer proliferativ-aktiven Phase befinden.

Die Funktion von Ki67 ist noch nicht hinreichend geklärt und für diese Arbeit nicht von Bedeutung. Lange wurde vermutet, dass es sich bei Ki67 nur um ein großes Strukturprotein handelt, welches DNA-Bindungseigenschaften hat (Sawhney 1992). Neuere Ergebnisse weisen darauf hin, dass Ki67 auch regulatorische Eigenschaften besitzt. Ki67 ist in der S- und G₂-Phase mit Chromatin stark assoziiert und während der Mitose mit Chromatiden ko-lokalisiert (Van Bockstaele 1991). Außerdem bindet Ki67 an alle Mitglieder der Heterochromatin-Protein-1-Familie (HP-1) (Scholzen 2002). Dies könnte ein Anhaltspunkt für eine regulatorische Funktion von Ki67 innerhalb der Transkription sein, weil HP-1 mit Histonen interagiert und die Transkription unterdrückt (Nielsen SJ 2001). Hinweise darauf, dass Ki67 eine regulatorische Funktion besitzt, zeigen sich zudem in der Analyse der Primärstruktur des Proteins. Hierbei konnten potentielle Interaktionsstellen, wie Protein-Kinase-Konsensus-Sequenzen, ATP/GTP-Bindungsstellen und „forkhead-assoziierte“ Domänen, gefunden werden (Schlüter 1993, Hofmann 1995, Starborg 1996). Ferner führt eine Mikroinjektion von Anti-Ki67-Antikörper zum Zyklusarrest (Starborg 1996, Heyden 1997).

3.6.2 Cyklinkinase Inhibitoren

Die Cyklinkinasen-Inhibitoren (CKI) können in zwei Familien eingeteilt werden. Die Cip/Kip-Familie (p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}) inhibiert alle cyclinabhängigen Kinasen (Cdk) und spielt deswegen an allen Restriktionspunkten des Zellzyklus eine Rolle. Die INK4-Familie (p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}) kann nur Cdk4 und Cdk6 inhibieren

und ist insofern nur für die Kontrolle des Restriktionspunktes von G1/S relevant. Ihre Funktion hängt von einem intakten Retinoblastoma-Protein (Rb) ab (Sherr 2001). Alle CKI's verhindern die Aktivierung von Cdk's durch Cdk7 in Verbindung mit der Cdk-aktivierenden Kinase (CAK), indem sie entweder eine Konformationsänderung induzieren oder ein sterisches Hindernis darstellen (Aprelikova 1995; Kaldis 1999). Im Folgenden soll insbesondere auf den Cyklinkinase-Inhibitor p21^{waf-1/cip} ausführlich eingegangen werden sowie p16^{INK4a} und p14^{ARF} in Bezug auf HHV 8 assoziierte Erkrankungen.

3.6.2.1 Funktion von p21^{waf-1/cip}

Das Protein p21^{waf-1/cip} (p21) ist ein multifunktionales Protein. Neben der Inhibition der Cyklinkinasen (Harper 1993) spielt es auch an anderen Stellen in der Regulation von Zellzyklus und Apoptose eine Rolle. Im Folgenden sollen die Funktionen von p21, sofern sie für diese Arbeit relevant erscheinen, veranschaulicht werden. Für die ausführliche Behandlung dieses Themas sei auf die Reviews (Sherr 1996, Sherr 2000, Roninson 2002, Dotto 2000, Dyson 1998, Boulware 2000) verwiesen.

Das Protein p21 gehört zu der Cip/Kip-Familie (El-Deiry 1993, Gu 1993, Harper 1993). Folglich spielt p21 nicht nur in der Restriktionspunkt-Kontrolle von G1/S eine Rolle, sondern auch in der weiteren Progression des Zellzyklus und kann auch einen Zyklusarrest in der G2-Phase induzieren (Chang BD 2000, McShea 2000).

P21^{waf-1/cip-1} inhibiert unter anderem auch die Cyclin-Cdk Komplexe, die das Retinoblastoma-Protein (Rb) phosphorylieren können. Das Rb bindet Proteine der E2F-Familie. Liegt E2F im Komplex mit Rb vor, werden E2F-Promotoren aktiv inhibiert (Hamel 1992, Weintraub 1992,

Sellers 1996, Sellers 1997). Wird es durch den Cyclin-D/Cdk6-Komplex und den Cyclin-E/Cdk2-Komplex phosphoryliert, dissoziiert E2F von dem hyperphosphorylierten Retinoblastoma-Protein.

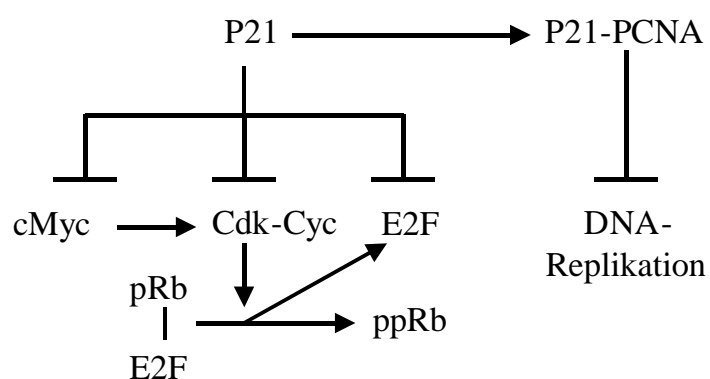
Das dissoziierte E2F liegt als Heterodimer mit DP-1 oder DP-2 vor. In dieser Form aktiviert es Promotoren von Genen, die für die Progression des Zellzyklus von Bedeutung sind, wie DHFR, TK, TS, POL, CDC2 und E2F-1 selbst (Sherr 1996). Eine Ausnahme bildet lediglich E2F-6 (Morkel1997, Trimarchi 1998).

P21 besitzt mindestens drei bekannte regulative Funktionen, die einen Einfluss auf E2F und Rb und somit auf die Progression des Zellzyklus haben:

P21 kann, wie oben beschrieben, in seiner Funktion als CKI die Dissoziation des E2F/Rb-Komplexes indirekt verhindern.

P21 bindet und inhibiert ungebundenes E2F direkt (Delavaine 1999) und greift somit *downstream* der Rb-abhängigen Regulation ein.

Außerdem inhibiert p21 das Proto-Onkogen c-Myc (Kitaura 2000) und den STAT3-Transkriptionsfaktor (Coqueret 2000). Somit greift es *upstream* von Rb ein, wodurch die Produktion von zyklusrelevanten Proteinen, die über diese Signalübertragungswege produziert werden, verhindert wird. Zu diesen zyklusrelevanten Proteinen gehören auch Cykline und CDK's (Pajic 2000).



Das Protein p21 bindet außerdem an dem „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA), wodurch es die eukaryotische DNA-Replikation hemmt. Durch die Bindung von p21 werden jedoch nicht die Reparatoreigenschaften von PCNA blockiert (Paunesku 2001).

Es gibt jedoch auch Hinweise, die dem Modell von „p21 als Inhibitor des Zellzyklus“ zu widersprechen scheinen. Unter gewissen stöchiometrischen Bedingungen kann p21 sowohl Cdk4 als auch Cdk6 stimulieren und eine Progression des Zellzyklus bewirken (Bearss 2002; Jones 1999). Dies ist insofern relevant, weil eine nachgewiesene p21-Produktion nicht ohne weiteres bedeutet, dass sich die Zelle im Zyklusarrest befindet. Nur wenn zusätzlich ein Effekt der p21 Expression, beispielsweise eine geringe Proliferation, nachgewiesen werden kann, ist anzunehmen, dass es sich auch wirklich um einen p21-vermittelten Zyklusarrest handelt. Eine Quantifizierung der Proliferationsrate kann unter anderem mittels flowzytometrischer Untersuchungen oder immunhistochemisch durch den Proliferationsmarker Ki67 erfolgen.

Neben der Regulation des Zellzyklus spielt p21 in der Inhibition der Apoptose eine wichtige Rolle. Es bindet an pro-apoptotische Proteine, wie der Pro-Caspase 3, Caspase 8 und Caspase 10 (Dotto 2000).

3.6.2.2 Regulation von p21^{waf-1/cip-1}

Das p21^{waf-1/cip-1}-Protein kann über akkumuliertes p53 aktiviert werden sowie über Rb, interferon-abhängige Signalübertragungswege und andere p53-unabhängige Signalübertragungswege. Im Folgenden werden die einzelnen Regulationen näher erläutert.

- *Aktivierung von p21 über p53 und dessen Bedeutung insbesondere bei Zellen, die mit Herpesviren infiziert sind:*

P53 wird ständig von der Zelle produziert und über Ubiquitinierung abgebaut (Oren 1999). Schon geringe Einflüsse, die einen fehlerfrei ablaufenden Zellzyklus beeinflussen könnten, führen zu einer Akkumulation von p53 durch posttranskriptionale Stabilisation (Oren 1999). Eine p53-Akkumulation kann durch DNA-Schäden oder Hypoxie verursacht werden, aber auch durch Überexpression von Proto-Onkogenen, wie Cyclinen (Sherr 1995, Reed 1997, Oren 1999, Spruck 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die DNA-abhängige Kinase (DNA-PKcs), die für den DNA-Doppelstrang-Reparaturmechanismus von Bedeutung ist (Gao 1998), p53 phosphorylieren und somit stabilisieren kann (Take 1996).

Da bei Herpesviren die virale Replikation und die Synthese der Viruspartikel im Nukleus stattfinden, treten hier besonders häufig fehlerhafte DNA-Strukturen auf, die einen p53-abhängigen p21-induzierten Zyklusarrest bewirken (Feng 2004 Kapitel 3.2.4).

- *Aktivierung von p21 über Rb:*

Das Retinoblastoma-Protein (Rb) besitzt die Fähigkeit, E2F-Promotoren zu unterdrücken (Weintraub 1992, Sellers 1996, Sellers 1997). Eine weitere Funktion von Rb ist die Aktivierung von E2F-unabhängigen Promotoren. Hierzu gehört unter anderem der Promotor für das CCAAT/enhancer-binding Protein- α (C/EBP α) (Sellers 1997).

C/EBP α ist ein potenter Aktivator des p21-Promotors (Cram 1998) und kann durch seine Bindung an p21 die Zelle in den G1/S-Block versetzen (Harris 2001). C/EBP α bildet mit Rb einen Komplex, der seine eigene Transkription aktiviert (Charles 2001). Die Inhibition der Zellproliferation durch C/EBP α benötigt weder p53 noch Rb, was dafür spricht, dass

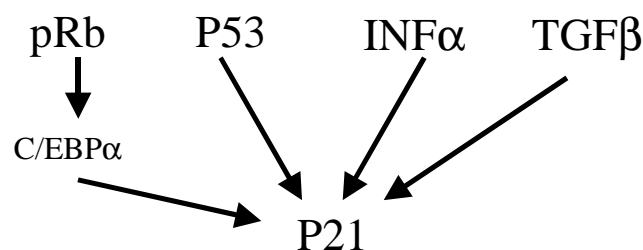
auch andere Signalübertragungswege einen G1/S-Block über dieses Protein induzieren können (Hendricks-Taylor 1995).

- *Interferon-abhängige Transaktivierung von p21:*

IFN- α kann über p21 einen Zyklusarrest induzieren (Chin 1996, Harvat 1996, Hobeika 1997, Sangfelt 1997, Subramaniam 1997). Es wird angenommen, dass dieser Mechanismus in den virusinfizierten Zellen dem Schutz der Wirtszelle vor viraler Replikation dient. Durch den Zyklusarrest kann die virale Replikation aus Mangel an Nukleinsäuremetaboliten nicht suffizient stattfinden, weil die Substrate fehlen (Moore 1998, Fields Virology 2001: S. 2824).

- *Aktivierung über andere p53-unabhängige Signalübertragungswege:*

Neben den oben genannten Transaktivierungen, kann der p21-Promotor auch über andere p53-unabhängige Signalübertragungswege aktiviert werden, beispielsweise über TGF β oder experimentell durch Mimosin (Datto 1995, Alban 1996).



- *Aktivierung von p21 über Herpesvirusproteine und die Bedeutung des p21-abhängigen Zyklusarrestes in der lytischen Phase der viralen Replikation von Herpesviren:*

Es konnte für einige Herpesviren gezeigt werden, dass in der lytischen Phase der viralen Replikation ein p21-abhängiger Zyklusarrest in der G2/M-Transition vorliegt. An dieser Induktion beteiligte Herpesvirus-Proteine sind ICP-0 von HSV, IE1 und IE2 von CMV und Zta von EBV

(Flemington 2001). Es wird angenommen, dass der p21-abhängige Zyklusarrest während der G2/M-Transition mit konsekutiver Synthese von replikationsrelevanten Proteinen für das Virus eine gute Voraussetzung bietet, um sich effizient replizieren zu können. Denn unter diesen Umständen findet zwischen viraler und zellulärer Replikation keine Konkurrenz um den Nukleotid-Pool statt (Flemington 2001).

Analogien zu dem EBV-Protein Zta sind für das HHV 8-codierte Protein K-bZIP/RAP (RAP) beschrieben worden (Wu 2002). RAP und Zta interagieren hierbei mit dem CCAAT/enhancer-binding-Protein- α (C/EBP α) und verhindern über die Inhibition der G2/M-Transition durch p21 die Mitose der Zelle (Wu 2002).

Daraus ergibt sich, dass der p21-induzierte Zyklusarrest in der lytischen Phase der viralen Replikation eine wichtige Rolle spielt.

3.6.2.3 p16^{INK4a} und p14^{ARF}: Funktion und Bedeutung im KS und PEL

Das INK4a-Gen kodiert zwei Tumor-Suppressoren auf Chromosom 9q12, den Cyklinkinase-Inhibitor (CKI) p16 und einen weiteren, den p14^{ARF} (bei der Maus p19^{ARF}). Beide spielen über zwei unterschiedliche Mechanismen in der Initiierungsphase des Zyklus eine zentrale Rolle (Sherr 2001).

P16 gehört zu denjenigen CKI's der INK-Familie, die spezifisch Cyclin-D/cdk6-Komplexe hemmen können. Somit spielen sie in der Initiierungsphase des Zellzyklus eine wichtige regulatorische Funktion (Sherr 1996).

Der Verlust von p16 führt bei einer normalen Entwicklung des Organismus zu einer starken Zunahme von Malignomen. INK4a^{-/-}-Knockout-Mäuse entwickeln nach wenigen Monaten spontan

verschiedenste Tumoren (Serrano 1996, Sherr 1996).

Eine Vielzahl von Tumoren sind mit Mutationen von INK4a assoziiert. Hierzu gehören Melanome, Gallenwegskarzinome und Ösophaguskarzinome. Homozygote Deletionen treten auf beim Gliom, Mesotheliom, nasopharyngealen Karzinom, ALL, diversen Sarkomen, Blasenkarzinom, Pankreaskarzinom, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom sowie Ovarialtumoren (Hall 1996, Elledge 1995, Sherr 1996).

P14 spielt im negativen Feedback der Initiierung des Zellzyklusses über Rb eine Rolle. Es führt über MDM-2 zu einer Stabilisierung und Akkumulation von p53 (Sherr 2001). Mutationen im p14/ARF-Gen gehen ebenfalls mit der Entstehung von Malignomen einher. Am häufigsten sind Sarkome, gefolgt von Lymphomen und Carzinomen des Zentralnervensystems (Kamijo 1999).

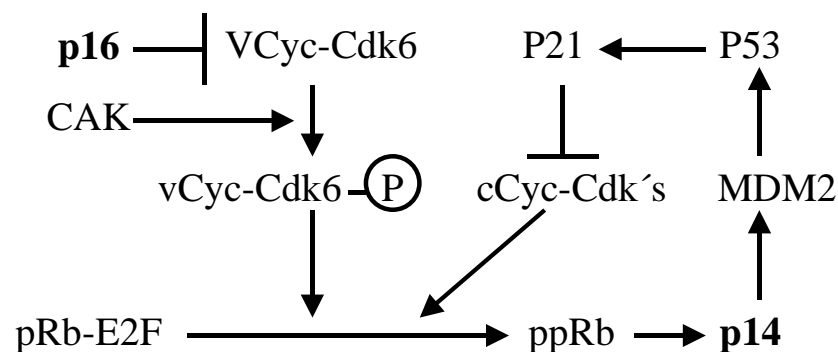
Die Folgen des Funktionsverlustes von p16 oder p14 sprechen für deren Relevanz in der Zykluskontrolle. Im Folgenden soll erläutert werden, dass dies auch in HHV 8-assoziierten Erkrankungen eine Rolle spielt.

Die Abwesenheit von p16 in PEL-Zelllinien wurde festgestellt. Eine ektope Expression von p16 in diesen Zelllinien führt zum Zyklusarrest (Platt 2000). Außerdem hat p16 einen regulativen Einfluss auf das virale Cyclin (vCyc). Es konnte gezeigt werden, dass der Komplex vCyc/Cdk6 durch p16 inhibiert werden kann, sofern er nicht durch die Cyclin-aktivierende Kinase (CAK) phosphoryliert wird (Kaldis 2001).

Auch die Abwesenheit von p14 spielt hierbei eine Rolle. So hat vCyc nur dann onkogene Eigenschaften, wenn zusätzlich eine Störung im negativen Feedback-Mechanismus von p14, MDM2 und p53 vorliegt (Verschuren 2002, Verschuren 2004).

Demnach ist die An- oder Abwesenheit von p16 und p14 in der Zyklusregulation HHV 8-infizierter Zellen von Bedeutung. Welchen

Einfluss dieser Defekt für das KS hat, ist noch nicht bekannt. Differenzen in der molekularen Pathogenese der Zykluskontrolle zwischen KS und PEL könnten allerdings deren unterschiedliches Proliferationsverhalten erklären. So könnte es sein, dass der Regelkreis über die CKI's im KS funktioniert und im PEL insuffizient ist. In dieser Arbeit soll unter



Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Sachverhalt erörtert werden.

3.6.3 Interferon- α (IFN α) und dessen Rolle im KS

Durch die Infektion mit Viren kommt es bei einem intakten Immunsystem zur Freisetzung von antiviralen Faktoren. Zu diesen Faktoren gehören Interferone (IFN). Es konnte gezeigt werden, dass Interferone an vielen Stellen der Zellzyklusregulation Einfluss nehmen. Sie verhindern die Phosphorylierung von Rb, reduzieren die Bindungsaktivität von E2F an die DNA, vermindern die Konzentrationen von c-myc und Cyclin A und verringern die Aktivität von Cdk2-Komplexen (Kimchi 1992, Mellamed 1993, Zhang 1994). IFN können bei viraler Infektion Zyklusarrest und Apoptose initiieren (Roos 1984 Stark 1998, Tangiushi 2001). Der Zyklusarrest, der durch Interferon- α (IFN α) zustande kommt, ist p21-vermittelt (Chin 1996, Harvat 1996, Hobeika 1997, Sangfelt 1997, Subramaniam 1997).

IFN hemmt im KS und in HHV-8-infizierten Zellen das Wachstum (D'Augustino 1999) und führt zu einer Abnahme der Viruslast (Monini

1999). Außerdem liegen IFN α -exprimierende plasmazystoide Dendritische Zellen in der Haut von KS-Patienten vermindert vor (Vaccari 2004). Die zentrale Bedeutung von IFN im KS verdeutlicht ein Fallbericht eines Kindes, das an einem disseminierten Klassischen KS erkrankt ist. Normalerweise findet man diese Form des KS nur im Alter. In diesem Fall konnte ein isolierter IFN-Rezeptordefekt nachgewiesen werden, der die Immuninkompetenz erklärt (Camicioglu 2004). Zudem wird IFN in der Therapie des KS erfolgreich eingesetzt (Krown 1983, Evans 1991, Krown 1998, Krown 2002, Morini 2004, Zioga 2004).

Zusammengefasst zeigen diese Sachverhalte, dass die Abwesenheit von IFN einen wichtigen Ko-Faktor in der Pathogenese des KS darstellt. Außerdem haben Viren „Strategien“ entwickelt, um den Einfluss von IFN zu umgehen. HHV 8 kodiert ebenfalls Proteine, welche die IFN-abhängige Signaltransduktion inhibieren. Zu diesen Proteinen zählen vIL 6 und vIRF-1. Die Einflussnahme von vIL 6 wurde bereits in Kapitel 3.5.3 besprochen. Durch die Bindung an gp130 wird der IFN-abhängige Zyklusarrest über p21 verhindert (Chatterjee 2004).

3.7 Funktion und Expressionsmuster von CD31 und CD34

3.7.1 CD31 (PECAM-1)

CD31 ist das membranständige Glykoprotein-IIa (gpIIa), dessen deskriptive Bezeichnung „Platelet endothelial cell adhesion Molecule 1“ (PECAM-1) ist. CD31 wird von Endothelzellen, Thrombozyten, Leukozyten und deren Vorläuferzellen exprimiert. CD31 ist ein guter Endothelzellmarker für Lymphendothelien (LEC) und Blutendothelien (BEC). Durch seine Expression an der luminalen Membran der

Endothelien wird die Morphologie der Gefäße besser sichtbar. Diese Eigenschaft wird in dieser Arbeit zur besseren Beurteilung der Gefäße genutzt.

Hohe Konzentrationen werden insbesondere an den Verbindungsstellen zwischen Endothelzellen festgestellt. Monozyten, neutrophile Granulozyten und NK-Zellen exprimieren CD31 diffus. Einige T-Zellen, aber keine zirkulierenden B-Zellen exprimieren CD31.

CD31 wird in 80 bis 100 % der Angiosarkome und Hämangiome exprimiert. Im Kaposi-Sarkom kann ebenfalls CD31 nachgewiesen werden (Russell Jones 1995).

Die funktionellen Eigenschaften von CD31 haben für diese Arbeit keine Bedeutung und sollen nur kurz erwähnt werden. CD31 kann homophob binden (CD31-CD31-Interaktion) und führt damit zu Endothelzell-Endothelzell-Interaktionen und Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen. Es ist aber auch an (heterophoben) Interaktionen mit anderen Proteinen beteiligt. Neben den Zellinteraktionen konnte gezeigt werden, dass die Bindung an CD31 zu intrazellulären Signaltransduktionen führt. Leukozyten und Thrombozyten, die an CD31 binden, aktivieren Integrine der Beta-Familie (β -Integrine). Die Aktivierung verschiedener β -Integrine ist von der interagierenden Zelle abhängig. CD31 besitzt eine wichtige Funktion in der Diapedese von Leukozyten. Mit Antikörpern blockiertes CD31 verhindert die Diapedese diverser Leukozyten, ohne die Adhäsion zu beeinflussen.

3.7.2 CD34

CD34 ist ein transmembranes Glykoprotein (gp 105-120). Es wird vor allem von lympho-hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen und kleinen Gefäßendothelzellen exprimiert und dient vornehmlich als Marker

für die Hämatopoese und Endothelzelldifferenzierung (Civin 1984, Katz 1985, Andrews 1986, Fina 1990, Beschorner 1985, Baumhüter 1994). CD34 ist ein guter Endothelzellmarker für Blutendothelien. Wie bei CD31 wird durch die Expression von CD34 an der luminalen Zellmembran der Blutendothelzellen die Morphologie der Gefäße besser sichtbar.

Neben diversen Leukämien lässt sich CD34 bei Angiosarkomen (~70 %), hepatischen Hämangioendotheliomen (100 %) und bei dem Kaposi-Sarkom (~90 %) nachweisen (Delia 1993, Anthony 1991, Sankey 1990).

4 Material

4.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv besteht aus zwei verschiedenen Gruppen. Die eine Gruppe beinhaltet diagnostische Exzisate von Kaposi-Sarkomen, die andere setzt sich aus diversen Geweben von Sektionsmaterial verstorbener Patienten mit Kaposi-Sarkomen zusammen.

4.1.1 Diagnostische Exzisate von Kaposi-Sarkomen

Das Kollektiv beinhaltet diagnostische Exzisate von Kaposi-Sarkomen, die sich untergliedern in angiomatoide Frühformen (KS-A; n=20) und sarcomatoide, spindelzellreiche Spätformen (KS-S; n=20). Es handelt sich um Exzisate von ausschließlich männlichen HIV-positiven Patienten, die sich zum Zeitpunkt der Entnahme nach der Einteilung des Center of Disease Control im Stadium CDC 3 befanden. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug für KS-A 43 Jahre (Standardabweichung: 8,5 J; Min: 29 J; Max: 63 J) und für KS-S 41 Jahre (Standardabweichung: 10; Min: 32 J; Max: 61 J).

Die Exzisate wurden aus unterschiedlichen Geweben entnommen. Davon stammen aus der Haut 24, den Schleimhäuten im oropharyngealen Bereich 12 und aus Lymphknoten 4 diagnostische Exzisate.

4.1.2 Sektionsmaterial

Das Kollektiv besteht aus 21 Sektionsfällen aus den Jahren 1985 bis 1995. Als Positivkontrolle dient der Nachweis von LANA in einem KS. In

drei Fällen konnte dieser Nachweis nicht erfolgen, weshalb sie nicht in die Untersuchung einbezogen werden. Es wurden vier Gewebe untersucht: Lunge, Lymphknoten, Milz und Leber.

Bei dem Kollektiv handelt es sich ausschließlich um männliche Verstorbene, die zum Zeitpunkt des Todes HIV-positiv im Stadium CDC 3 waren. Bei der Sektion werden Kaposi-Sarkome makroskopisch und mikroskopisch beschrieben. Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt des Todes beträgt 40 Jahre (Standardabweichung: 11,7 J; Min: 25 J; Max: 70 J).

4.2 Histopathologische Basisdiagnostik

Das Material wurde im Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München in den Jahren 1986 bis 2000 befundet und asserviert.

Die morphologische Diagnose der KS wurde anhand der Kriterien von Enzinger und Weiss durchgeführt (Enzinger und Weiss 1996).

Weitere Informationen zu den einzelnen Fällen sind den Tabellen im Anhang zu entnehmen.

5 Methoden

5.1 Theoretische Grundlagen der Immunhistologie

Der immunhistochemische Nachweis eines Proteins besteht aus der Bindung des Primärantikörpers an die antigene Determinante, der Nachweis des Primärantikörpers durch ein Detektionssystem und der Farbreaktion in Abhängigkeit des verwendeten Enzyms (HRP oder AP). Im Folgenden sollen die verwendeten immunhistochemischen Methoden näher erläutert werden.

5.1.1 Grundlegende Prinzipien der Immunhistologie

Bei immunhistochemischen Methoden kann mit Hilfe eines Antikörper-Nachweissystems ein bestimmtes Protein nachgewiesen werden. Grundsätzlich wird dabei das Präparat mit einem Primärantikörper inkubiert, welcher spezifisch an einem Epitop (antigene Determinante) des nachzuweisenden Proteins bindet.

Bei den Primärantikörpern werden monoklonale und polyklonale Primärantikörper unterschieden. Gehen die Antikörper aus einer klonalen B-Zelllinie hervor, spricht man von monoklonalen Antikörpern. Sie besitzen aufgrund ihrer Strukturgleichheit identische Funktionalität, unter anderem in ihrer Affinität gegenüber einem einzigen Epitop und seiner Diffusionsfähigkeit.

Werden die Antikörper in unterschiedlichen B-Zellen synthetisiert, ist die Strukturgleichheit nicht mehr gegeben. Man spricht von polyklonalen Antikörpern. Sie zeigen unterschiedliche Eigenschaften in der Position des Epitops und der Affinität. Polyklonale Antikörper haben somit im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern eine geringere Spezifität, weil die

Strukturvielfalt der Antikörper untereinander die Wahrscheinlichkeit der unspezifischen Bindung erhöht.

Durch die Bindung des Primärantikörpers an die antigene Determinante des Proteins entsteht ein Antigen-Antikörper-Komplex. Der Nachweis dieses Komplexes kann durch verschiedene Nachweismethoden erfolgen. Hierbei wird die direkte Immunhistochemie von der indirekten Immunhistochemie unterschieden.

Bei der direkten Immunhistochemie ist der Primärantikörper unmittelbar mit einem Enzym konjugiert, welches bei Zugabe bestimmter Reagenzien eine Farbreaktion katalysiert, so dass die erfolgreiche Konjugation des Antikörpers am Antigen mikroskopisch detektierbar ist. Die direkte Methode ist im Vergleich zu anderen Methoden spezifischer, besitzt aber eine geringere Sensitivität. Außerdem ist die Konjugation des Primärantikörpers aufwendig. Demzufolge werden der direkten Methode oft indirekte Methoden vorgezogen.

Bei der indirekten Immunhistochemie ist der Primärantikörper nicht unmittelbar mit einem Enzym konjugiert. Hier wird in einem zweiten Schritt ein Sekundärantikörper, der gegen das F_c-Fragment des primären Antikörpers gerichtet ist, verwendet. Der sekundäre Antikörper kann beispielsweise mit einem Enzym konjugiert sein, wie es bei der Dextranmolekül-Methode (Envision[®]-HRP) der Fall ist, er kann mit Biotin konjugiert sein, wie bei der ABC-Methode, oder aber gegen einen weiteren Antikörper gerichtet sein, wie es bei der APAAP-Methode der Fall ist.

Die hier verwendeten Systeme sind alle mit Enzymen konjugiert, die eine Farbreaktion zur Lokalisation des Antigen-Antikörper-Konstruktes katalysieren, deren Produkt lichtmikroskopisch nachgewiesen werden kann. Die immunhistochemischen Experimente werden mit

Standardtechniken unter Verwendung kommerziell erhältlicher Nachweismethoden durchgeführt.

5.1.2 Immunhistochemische Koexpression

Die immunhistochemische Koexpression unterscheidet sich von der immunhistochemischen Monoexpression durch den Nachweis von nicht nur einem Protein, sondern von mindestens zwei Proteinen auf einer Gewebeprobe gleichzeitig. Die einzelnen Schritte des Nachweises können hintereinander erfolgen. Möglich ist auch die Mischung der Reagenzien der Monoexpressionsverfahren gemäß der Reihenfolge der Inkubationsschritte. Letzteres Verfahren hat den Vorteil, dass die Dauer des Experiments stark verkürzt ist. Der Nachteil liegt in der Gefahr, dass unerwünschte Interaktionen der Reagenziengemische untereinander auftreten. Im Rahmen einer Fehlersuche sind solche Interaktionen schwer nachzuvollziehen und können somit bei der systematischen Austestung zur Optimierung des Versuchs Probleme bereiten. Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit die Detektionsverfahren hintereinander durchgeführt.

Bei der immunhistochemischen Koexpression müssen die Parameter der beiden Monoexpressionen aneinander angeglichen werden. Einige Parameter können nicht verändert werden, da sie beispielsweise von Eigenschaften des Primärantikörpers abhängen. Andere Parameter müssen verändert werden, weil die Gefahr der Kreuzreaktion zwischen den beiden Detektionen besteht. Zur Optimierung des Ergebnisses können bestimmte Parameter variiert werden. Zu ihnen gehören die Konzentration des Primärantikörpers und die Inkubationsparameter (Inkubationszeit und Inkubationstemperatur).

Zum Nachweis des Antikörperkonstruktes gibt es verschiedene

Färbereagenzien. Die Wahl des Färbereagenzes ist primär abhängig von dem verwendeten Enzym (HRP oder AP), das den Farbumschlag katalysiert. Bei der Koexpression spielt zusätzlich der Kontrast zwischen den verwendeten Farben und ihrer Mischfarbe eine Rolle, sowie die Abgrenzung zu der Gegenfärbung.

Um ein gut auswertbares Ergebnis bei immunhistochemischen Koexpressions-Experimenten zu erzielen, müssen demnach die Parameter angeglichen werden und die Färbereagenzien so gewählt werden, dass sie untereinander und mit ihren Mischfarben einen guten Kontrast bilden.

5.1.3 Immunhistochemischer Nachweis von LANA am Sektionsmaterial

Der immunhistochemische Nachweis von LANA am Sektionsmaterial ist eine hier erstmals vorgestellte Detektionsmethode von HHV-8-infizierten Zellen *ex vivo* im gesamten Organismus. Sie ermöglicht eine Kombination des Nachweises von HHV 8 mit der morphologischen Untersuchung von Organen, Geweben oder Erkrankungen.

Der Nachweis von Proteinen mit Hilfe der Immunhistochemie am Sektionsmaterial ist allerdings oft nicht möglich, da Sektionsmaterial auf Grund der unterschiedlichen Liegezeit zwischen Tod und Fixation autolytischen Prozessen unterworfen ist. Demnach werden Antigene durch den Primärantikörper häufig nicht erkannt. Aus diesem Grund muss der immunhistochemische Nachweis von LANA am Sektionsmaterial getestet werden.

5.2 Eigenschaften der verwendeten Primärantikörper

In dieser Arbeit werden folgende Proteine mittels immunhistochemischer Detektionsmethoden nachgewiesen.

Der monoklonale **LANA-Antikörper** (IgG_{2c}-Ratte, Klon LN53, Advanced Biotechnologies, Columbia Maryland/USA) ist gegen das LANA-Protein von ORF-73 des viralen HHV-8-Genoms gerichtet.

Der monoklonale **Ki67-Antikörper** (IgG Maus, Klon MIB1, Dianova, Hamburg) ist gegen das humane Ki67-Protein gerichtet, dessen Epitop nicht näher charakterisiert ist.

Der monoklonale **WAF-1-(AB-1)-Antikörper** (IgG Maus, Klon EA10, Calbiochem, Cambridge MA/USA) ist gegen ein Epitop (AS 58-77) des humanen p21-Proteins gerichtet.

Der monoklonale **CD31-Antikörper** (IgG_{1κ}-Maus, Klon M0823, DAKO, Glostrup) ist gegen ein humanes Glykoprotein (gpIIa; 100 kD) der Endothelzellen gerichtet. Es wird auch *Platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM-1) genannt und wird in 80 bis 100 % der Fälle im Angiosarkom und Hämangiom exprimiert.

Der monoklonale **CD34-Antikörper** (IgG Maus, Klon QBEND10, Serotec, Wiesbaden) ist gegen das humane CD34-Protein von endothelialen Vesikeln gerichtet. CD34 ist ein sensibler Marker für die endotheliale Differenzierung und kann in 70 % der Fälle beim Angiosarkom und zu 90 % der Fälle im Kaposi-Sarkom nachgewiesen werden.

Der monoklonale **p53-Antikörper** (IgG-Maus, Klon DO-7, DAKO, Glostrup) ist gegen ein Epitop im N-Terminus des humanen p53-Proteins (AS 19-26) gerichtet und bindet sowohl am Wildtyp als auch an der Mutante des P53-Proteins.

Der monoklonale **Bcl₂-Antikörper** (IgG Maus, Klon 124, DAKO, Glostrup) ist gegen die Aminosäuresequenz 41-54 des humanen Bcl₂-Proteins gerichtet.

Der monoklonale **Bcl-X_L-Antikörper** (IgG Maus, Klon 2H12, Zymed, San Francisco) ist gegen eine N-terminale Sequenz von Bcl-X_L gerichtet, wie sie im Menschen, der Maus und der Ratte vorkommt.

Der monoklonale **bax-Antikörper** (IgG-1_{Kappa} Maus, Klon 2D2, Zymed, San Francisco) ist gegen eine N-terminale Sequenz des menschlichen BAX-Proteins gerichtet.

5.3 Praktische Durchführung der Immunhistologie

5.3.1 Fixierung, Einbettung und Vorbehandlung der Gewebeproben

Nach der Entnahme werden die Biopsate in gepuffertem Formalin (4% phosphat-gepuffertes Formalin) für 24 bis 48 Stunden konserviert. Anschließend werden die Biopsate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (75 %, 96 %, ~100 % Ethanol) dehydriert. Die Dehydratation überführt das Gewebe aus dem physiologischen hydrophilen Zustand in einen lipophilen Zustand, was für das anschließende Einbetten in Paraffin (Paraplast, Fa. Vogel, Giessen, Deutschland) notwendig ist. Die so entstandenen Paraffinblöcke bieten eine gute Konservierung des Biopsates und eignen sich aus diesem Grund sehr gut zur langen Asservierung. Außerdem schützt das Paraffin das Biopsat vor mechanischer Beanspruchung.

Die Paraffinblöcke werden auf einem Mikrotom (Jung) mit Einwegklingen (Feather) in ca. 3µm dicke Präparate geschnitten. Diese werden auf

speziell präparierte Objektträger (Firma Menzel, Superfrost[®], Braunschweig) aufgetragen. Das so entstandene Ausgangsmaterial wird anschließend bei 37°C über Nacht in einen Brutschrank gestellt, was zusätzlich eine bessere Haftung des Präparats auf dem Objektträger gewährleistet.

Zur weiteren Verwendung muss dem Material das Paraffin entzogen werden. Zuerst wird das Paraffin mit Xylol aus dem Gewebe gelöst. Anschließend wird das Gewebe durch eine absteigende Alkoholreihe (100 %; 96 %, 75 %) und letztendlich durch destilliertes Wasser geführt. Hierdurch wird das Gewebe wieder in einen hydrophilen Zustand überführt. Dies ist eine Voraussetzung für die Diffusionsfähigkeit und Reagibilität der Reagenzien, die in der Immunhistochemie verwendet werden.

Die anschließende Antigendemaskierung wird in dieser Arbeit mittels Mikrowellenbehandlung in handelsüblichen Geräten (z.B. Panasonic NN-4241, Japan) und mikrowellenfesten Küvetten (TPX, Brand, Deutschland) bei 780 Watt durchgeführt. Das Material befindet sich dabei in einer Pufferlösung. Während der Mikrowellenbehandlung verdampfte Pufferlösung wird ersetzt. Es folgt eine Abkühlungsphase von 20 Minuten in der Pufferlösung mit anschließendem Waschschrift in TBS (s. Rezepturen).

Protokoll der Vorbehandlung:

Ausgangsmaterial: In Paraffin eingebettetes Gewebe, das in ca. 3µm dicke Präparate geschnitten und auf einen Objektträger fixiert wird.

Xylol, 30'

Ethanolreihe absteigend (100 %; 96 %; 75 %), je 5'

Aqua dest, 10'

Vorbehandlung mittels Mikrowellen (780 Watt) in Pufferlösungen oder enzymatisch, variabel
Abkühlen, 20' (nur bei Mikrowellenvorbehandlung)

Tris-Puffer spülen, 2x 5'

5.3.2 Verwendete immunhistochemische Detektionsmethoden

Zum Nachweis der Primärantikörper gibt es diverse Detektionsmethoden, die sich verschiedene Bindungseigenschaften von Molekülen zu Nutze machen. Zu den hier verwendeten Methoden zählen die ABC-Methode, Envision-HRP und die APAAP-Methode. Die einzelnen Methoden sollen im Folgenden dargelegt werden.

5.3.2.1 ABC-Methode und LSAB-Methode

Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC) und die LSAB-Methode basieren auf der Bindungsfähigkeit von Biotinmolekülen mit einem Avidinmolekül (Wood und Warnke 1981). Aus diesem Grund können an einem biotinylierten Sekundärantikörper Komplexe binden, die Avidin enthalten. Im Unterschied zu der ABC-Methode, wo ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex an dem biotinylierten Sekundärantikörper bindet, ist bei der LSAB-Methode das Avidin-Molekül mit Peroxidase markiert. Da die Detektionssysteme auf einem mit Peroxidase katalysierten Nachweis beruhen, muss die endogene (zellulär synthetisierte) Peroxidase, die im Gewebe vorhanden ist, an ihrer katalytischen Funktion gehindert werden. Hierfür wird das Präparat mit 7,5 % Wasserstoffperoxid (H_2O_2) inkubiert. Dies führt zu einer

irreversiblen Blockade der endogenen Peroxidase.

Außerdem muss gewährleistet sein, dass die Antikörper, die im Nachweis verwendet werden, nicht unspezifisch an Strukturen des Gewebes binden. Diese sogenannte „Kreuzreaktion“ kann reduziert werden, indem das Gewebe mit Antikörpern inkubiert wird, die negativ geladene Proteine unspezifisch binden. In der Immunhistochemie wird dieser Vorgang „Proteinblockierung“ genannt. Die im Nachweissystem verwendeten Antikörper können somit im geringeren Maße unspezifisch binden, weil die negativ geladenen Strukturen durch die Proteinblockierung abgesättigt sind.

Protokoll für ABC-Methoden:

Für die Detektionssysteme ABC-Elite und LSAB.

Ausgangsmaterial: Nach der üblichen Vorbehandlung, wie oben beschrieben.

H₂O₂ (7,5 %), 10'

H₂O (fließendes Leitungswasser), 10'

Tris-Puffer spülen, 2x 5'

Proteinblockierung (bei ABC-Elite 20', bei LSAB 10')

Primärantikörper, 60' RT

Tris-Brij-Puffer spülen, 2x 5'

Sekundärantikörper (mit Biotin konjugiert), 30'

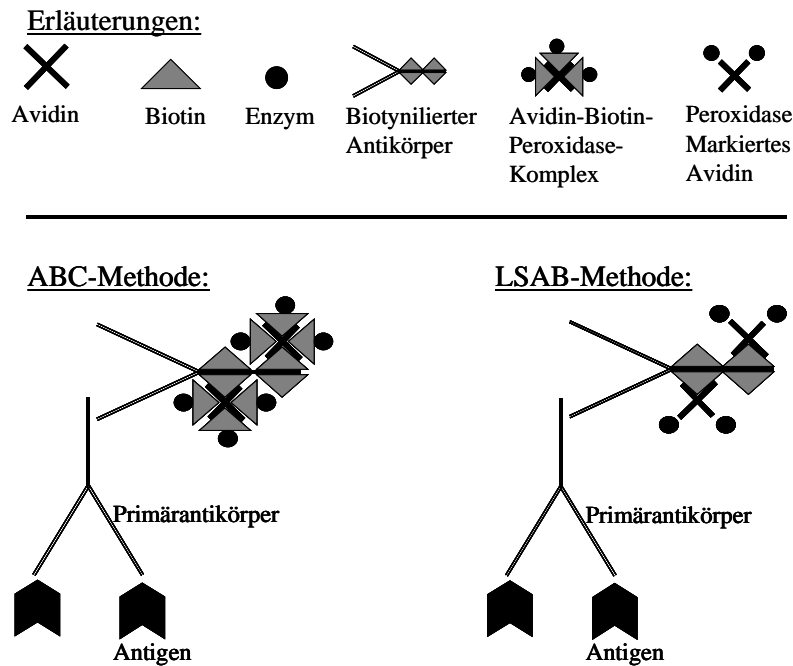
Tris-Brij-Puffer spülen, 2x 5'

HRP konjugierter Avidin-Biotin-Komplex, 30'

Tris-Brij-Puffer spülen, 2x 5'

Färbereagenz, variabel

H₂O (fließendes Leitungswasser), 10'



ABC- und LSAB-Methode: Der biotinylierte Antikörper bindet am Primärantikörper. Bei der ABC-Methode bindet der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, bei der LSAB-Methode Peroxidase-markiertes Avidin an dem biotinylierten Antikörper (Abbildung abgewandelt aus Naish: „Handbuch II Immunhistochemischer Färbemethoden“; DAKO®).

5.3.2.2 Dextranmolekül-Methode (Envision®-HRP)

Envision®-HRP ist, wie die verwendeten ABC-Systeme, ein HRP-katalysiertes Detektionssystem. Aus diesem Grund erfolgen die Blockierungsschritte (H_2O_2 und Proteinblock) und der Farbnachweis analog zur ABC-Methode. Der Unterschied zur herkömmlichen ABC-Methode besteht darin, dass nach der Inkubation des Primärantikörpers bei Envision®-HRP ein mit Sekundärantikörpern und HRP-Enzymen konjugiertes Dextranmolekül verwendet wird (Bisgaard 1993). Dies führt zu einer Amplifizierung des Signals und erhöht somit die Sensitivität.

HRP-Protokoll nach dem Envision-HRP-System:

Ausgangsmaterial: Nach der üblichen Vorbehandlung, wie oben beschrieben.

H₂O₂ (7,5 %), 10'

H₂O (fließendes Leitungswasser), 10'

Tris-Puffer spülen, 2x 5'

Proteinblock, 10'

Primärantikörper, 60' RT

Tris-Puffer spülen, 2x 5'

Envision-HRP Solution, 30'

Tris-Brij-Puffer spülen, 2x 5'

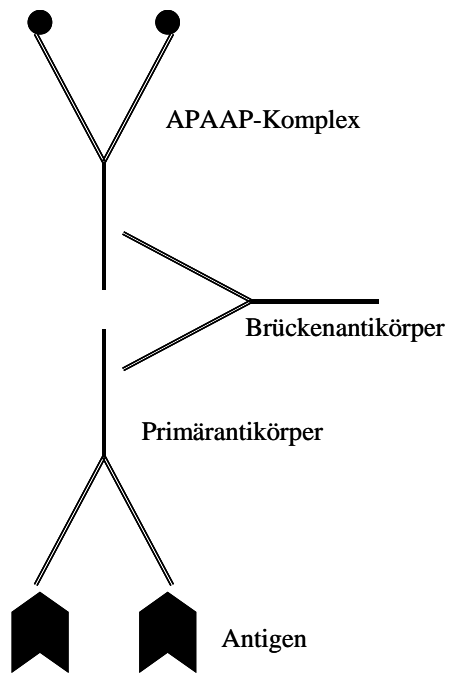
Färbereagenz, variabel

H₂O (fließendes Leitungswasser), 10'

5.3.2.3 APAAP-Methode

APAAP steht für „alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase“. Verwendet werden drei Reagenzien: Primärantikörper, Sekundärantikörper und der APAAP-Komplex. Der APAAP-Komplex ist eine Konjugation aus dem Enzym alkalische Phosphatase mit einem Antikörper. Dieser Antikörper wird in derselben Spezies synthetisiert wie der Primärantikörper. Aus diesem Grund bindet der Sekundärantikörper einerseits den Primärantikörper und andererseits den APAAP-Komplex, weswegen er auch als „Brückenantikörper“ oder „Link“ bezeichnet wird. Eine Besonderheit des APAAP-Systems ist, dass die Inkubation des Sekundärantikörpers und des APAAP-Komplexes zur Erhöhung der Sensitivität bis zu zweimal wiederholt werden kann (siehe Färbeprotokoll) (Cordell 1984).

Das entstandene Antigen-Antikörper-Enzym-Konstrukt kann durch eine Reaktion nachgewiesen werden, die unter den katalytischen Eigenschaften der alkalischen Phosphatase einen Farbumschlag zur Folge haben.



APAAP-Methode: Der Brückenantikörper bindet sowohl den Primärantikörper als auch den APAAP-Komplex.

APAAP Protokoll

Für die Detektionssysteme APAAP-Maus, APAAP-Ratte, „APAAP-spezial“.

Ausgangsmaterial: Nach der üblichen Vorbehandlung, wie oben beschrieben.

Primärantikörper, 60' RT

Tris-Brij-Puffer spülen, 2x 5'

Sekundärantikörper, 30'

Tris-Brij-Puffer spülen, 2x 5'

Anti-AP-Antikörper, 30'

Tris-Brij-Puffer spülen, 2x 5'

Sekundärantikörper*, 10'

Tris-Brij-Puffer spülen*, 2x 5'

Anti-AP-Antikörper*, 10'

Tris-Brij-Puffer spülen*, 2x 5'

Färbereagenz (Diverse Reagenzien für AP)

H₂O (fließendes Leitungswasser), 10'

5.3.3 Praktische Durchführung der immunhistochemischen Koexpression

Der formale Ablauf der Koexpressions-Experimente unterscheidet sich nicht von dem der Monoexpressionen. Allerdings können die variablen Parameter und die Inkubationsparameter differieren. Bei den hier beschriebenen Experimenten erfolgt der Nachweis der zwei Proteine hintereinander. Zuerst wird der Nachweis von LANA mit einem HRP-System durchgeführt, der anschließende Nachweis des zweiten Proteins erfolgt mittels eines AP-Systems.

Koexpressionsprotokoll: HRP-System & AP-System

Ausgangsmaterial: Nach der üblichen Vorbehandlung, wie oben beschrieben.

HRP-Protokoll, wie oben beschrieben

Tris-Puffer spülen, 2x 5'

APAAP-Protokoll, wie oben beschrieben

Gelingt die Umstellung auf ein AP-System nicht, müssen zwei HRP-Systeme hintereinander verwendet werden, weil LANA nicht mit einem AP-System nachgewiesen werden konnte. Um eine Kreuzreaktion der beiden HRP-Nachweissysteme miteinander zu verhindern, ist ein

* Die Schritte können in dieser Reihenfolge noch bis zu zweimal wiederholt werden, um eine höhere Sensitivität zu erhalten.

Blockierungsschritt mit 0,1n HCl-Lösung für 10' notwendig. Damit wird die Meerrettichperoxidase (HRP) des ersten Nachweises irreversibel blockiert.

Koexpressionsprotokoll: HRP-System & HRP-System

Ausgangsmaterial: Nach der üblichen Vorbehandlung, wie oben beschrieben.

HRP-Protokoll, wie oben beschrieben

HCl (0,1 molar) Blockierungsschritt der HRP, 10'

H₂O (fließendes Leitungswasser), 10'

Tris-Puffer spülen, 2x 5'

HRP-Protokoll, wie oben beschrieben

5.3.4 Gegenfärbung, Einbetten und Asservierung des Präparats

Nach dem durchgeführten immunhistochemischen Nachweis ist eine Gegenfärbung der Zellkerne mit beispielsweise Hämalun (siehe Rezept) 10 bis 30 Sekunden empfehlenswert, um die Morphologie des Präparats besser erkennen zu können. Für die Koexpression sind verschiedene Gegenfärbungen kommerziell erhältlich, die mit den verwendeten Färbereagenzien einen guten Kontrast bilden (siehe Anhang).

Anschließend wird das Präparat mit einem Deckglas versehen, das mit einem Eindeckmedium fixiert wird. Es gibt wasserlösliche und wasserunlösliche Eindeckmedien (s. Anhang). Die Wahl des Eindeckmediums ist von dem verwendeten Farbreagenz abhängig. Zum Einsatz kommen Kaiser's Glyceringelatine (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) und Vectamount (Vector Labs, Bulingame, UK).

Gegenfärbungen der Zellkerne und Eindecken des Präparats
Ausgangsmaterial: Nach dem immunhistologischen Nachweis.

Gegenfärbung mit:

Hämatoxylin ca. 10-30' (blau-violett)

Orcein 2-5' (rötlich)

H₂O (fließendes Leitungswasser), 10'

Eindecken der Präparate mit:

Kaisers Glyceringelatine (wasserlöslich)

VectaMount (wasserunlöslich)

Das Eindeckmedium ist von der verwendeten Farbe abhängig.

5.4 Auswertung und Kontrollen

5.4.1 Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse für die KS-Biopsate

Die Auswertung der Immunhistochemie erfolgt durch Zählungen der positiven Zellen in zehn Feldern mit Hilfe eines Netzwerkgitters der Größe 10 x 10 mm² (Carl Zeiss, Göttingen: Art.-Nr. 454020). Die ausgemessene und errechnete Fläche bei einer Vergrößerung von Faktor 10 (Okular) und Faktor 40 (Objektiv) ergibt 625 µm² (10 mm = 10⁴ µm; 10⁴ µm / 400 = 25 µm; 25² µm² = 625 µm²). Die zehn ausgezählten Flächen werden gemittelt.

5.4.2 Auswertung des Sektionsmaterials

Das Sektionsmaterial stammt aus 21 Obduktionen, bei denen ein KS nachgewiesen werden konnte. Das Kollektiv wurde zusammengestellt aus je einem KS, das als Positivkontrolle dient, sowie je einem Präparat aus Lymphknoten, Milz, Leber und Lunge. Zur Auswertung wurde zuerst die Positivkontrolle begutachtet und dann in den anderen Geweben nach vereinzelt LANA-positiven Zellen gesucht, die keine Beziehung zu einem Kaposi-Sarkom besitzen. Ausgeschlossen wurden Fälle, bei

denen im KS kein LANA nachgewiesen werden konnte, sowie Fälle, bei denen mikroskopisch ein KS vorlag, so dass nur vereinzelte LANA-positive Zellen dokumentiert wurden.

5.4.3 Kontrollen

In jedem Experiment wurde zusätzlich zum Kollektiv ein KS-Biopsat bzw. ein KS aus dem Sektionsmaterial der Haut mitgeführt. Das KS-Biopsat dient als standardisiertes Kontrollpräparat, um die verschiedenen Experimente miteinander vergleichen zu können.

Als Negativkontrolle wird in den Präparaten nach unspezifischen Anfärbungen von beispielsweise Bindegewebe gesucht. Bei verschiedenen Detektionen können weitere „interne Kontrollen“ Hinweise auf die erfolgreiche Durchführung des Experiments liefern. So zeigt sich bei LANA eine charakteristische granuläre Anfärbung im Zellkern. Bei der Detektion von Ki67 in Hautbiopsaten wird ein bestimmter Anteil der Kerne der basalen Hautschichten positiv, weiter oben gelegene Schichten bleiben dagegen negativ. Ki67, p21^{cip1/Waf-1} und p53 zeigen charakteristischerweise ein nukleäres Detektionsmuster. Die Endothelzellmarker CD31 und CD34 zeigen eine typische Anfärbung der luminalen Zellmembran von Blutgefäßendothelien.

5.4.4 Sicherheitsvorkehrungen

Arbeiten mit brennbaren, giftigen oder mutagenen Substanzen werden unter dem Abzug mit Schutzkleidung (Einweghandschuhe, Mundschutz, Laborkittel) entsprechend der arbeitsrechtlichen Bestimmungen durchgeführt. Chemikalien werden gemäß der Sicherheitsdatenblätter gelagert, verwendet und entsorgt.

6 Ergebnisse

In dieser Arbeit werden immunhistochemische Experimente an einem Kollektiv von diagnostischen Exzisaten von Kaposi-Sarkomen und an Sektionsmaterial durchgeführt. In dem Kollektiv wird die Expression von LANA quantifiziert. Anschließend werden Koexpressionsversuche von LANA mit diversen Proteinen im Kollektiv vorgenommen. Dabei dienen die Parameter der Primärantikörper für die Monoexpression als Anhaltspunkt für die Austestung der Koexpressionen (Tabelle 9 im Anhang). Getestet werden Ki67, p21, CD31, CD34, BAX, Bcl-2, Bcl-XL und P53. Auswertbare Ergebnisse werden bei den Koexpressionen von LANA mit Ki67, p21, CD31 und CD34 erzielt. Die Ergebnisse des Patientenkollektivs sind in Tabelle 6 und Tabelle 7 im Anhang zusammengefasst.

Des Weiteren wird der Nachweis von LANA an Sektionsmaterial erbracht. Der Antikörper für LANA muss unter den besonderen Bedingungen des Sektionsmaterials getestet werden. Im Anschluss wird in diversen Geweben (Lunge, Milz, Leber, Lymphknoten und KS) LANA immunhistochemisch nachgewiesen.

6.1 Technischer Teil: Etablierung immunhistochemischer Experimente

6.1.1 Etablierung der Monoexpression von LANA

Als Grundlage der weiterführenden Experimente wird der monoklonale Antikörper LN53, der gegen das virale Latency associated nuclear Antigene (LANA) gerichtet ist, in verschiedenen Konzentrationen (1:250 bis 1:10000) und verschiedenen Detektionssystemen (ABC-Elite-Rat,

APAAP-Rat) an diagnostischen Exzisaten von Kaposi-Sarkomen getestet. Ein gutes Ergebnis konnte mit ABC-Elite-Rat und einer Verdünnung des Primärantikörpers bei 1:8000 erzielt werden. Der Nachweis mit APAAP-Ratte war nicht möglich. Das Protokoll ist der Tabelle 2 zu entnehmen.

6.1.2 Etablierung der Koexpression von Ki67 mit LANA

Als Ausgangspunkt für die Austestung der Koexpression von Ki67 mit LANA wird das Standardprotokoll für die immunhistochemische Monodetektion benutzt (Tabelle 2). Der Primärantikörper für Ki67 ist ein monoklonaler Maus-Antikörper. Es sind keine Kreuzreaktionen mit dem Antikörper für LANA zu erwarten, weil dies ein monoklonaler Ratten-Antikörper ist. Da Ki67 standardmäßig mit Hilfe von APAAP-Maus nachgewiesen wird und LANA mit ABC-Ratte, muss das Detektionssystem nicht abgeändert werden.

In der Monoexpression von Ki67 wird Citrat-Puffer für 30 Minuten bei 750 Watt Mikrowelle als Vorbehandlung verwendet. Der Nachweis mit LANA erfolgt unter einer Vorbehandlung mit TRS-6-Puffer für 30 Minuten Mikrowelle. Aus diesem Grunde wird Ki67 in verschiedenen Verdünnungen (von 1:5 bis 1:150) mit der Vorbehandlung (TRS 6; 30 Minuten, Mikrowelle), gemäß dem LANA-Protokoll, ausgetestet. Konzentrationen von 1:50 bis 1:150 ergeben mit dem Chromogen Fast red[®] (DAKO) ein zufriedenstellendes Ergebnis.

Als nächster Schritt müssen für die Koexpression geeignete Chromogene gefunden werden, um im Präparat einen auswertbaren Kontrast zwischen dem Nachweis von LANA, von Ki67 sowie der Mischfarbe zu ermöglichen. Aus diesem Grunde muss eine Austestung der verschiedenen Farben erfolgen. Da beide Antigene kernständige

Proteine sind, muss auch die Mischfarbe von den beiden Farben deutlich abgrenzbar sein. Ausgetestet werden die Farben Vector red, Vector blue, NBT-BCP (DAKO) und AP-grün auf eine Verdünnung von 1:50 und 1:80 von MIB-1. Aus der Detektion mit Vector blue (Vectastain) resultieren bei den Verdünnungen 1:50 und 1:80 von MIB-1 gut auszuwertende Ergebnisse, die auch einen guten Kontrast zu AEC bieten.

Zuletzt wird die Koexpression durchgeführt, indem zuerst am Präparat LANA mit dem Standardprotokoll nachgewiesen wird und im Anschluss Ki67 unter verschiedenen Konzentrationen von 1:30 bis 1:150 getestet wird. Die Verdünnung 1:80 erzielt ein sehr gut auswertbares Ergebnis. Die beiden Farben und die resultierende Mischfarbe sind gut voneinander abgrenzbar. Durch die Verwendung von Vector blue gelingt allerdings kein guter Kontrast mit der Hämalaun-Kernfärbung. Aus diesem Grunde muss die Gegenfärbung weggelassen werden. Das Protokoll der Koexpression von LANA mit Ki67 ist in der Tabelle (Tabelle 3) zusammengefasst.

6.1.3 Etablierung der Koexpression von p21^{cip1/waf1} mit LANA

Verwendet wird als Ausgangspunkt das Standardprotokoll des Labors für die einfache Detektion von p21. Der Primärantikörper EA10 (Dianova[®]) ist ein monoklonaler Mausantikörper. Kreuzreaktionen mit dem LANA-Antikörper sind aus diesem Grunde nicht zu erwarten. Der Nachweis von p21 erfolgt nach Standardprotokoll mit APAAP-Maus. Da LANA mit ABC-Ratte nachgewiesen wird, können die Detektionssysteme beibehalten werden.

Die Vorbehandlung beim p21-Nachweis erfolgt standardmäßig mit dem

TUF-Puffer unter 30' Mikrowelle und muss an die Vorbehandlung von LANA (TRS6-Puffer; 30' Mikrowelle) angeglichen werden. Bei der Austestung erzielen die Verdünnungen von 1:30 bis 1:80 mit dem APAAP-Spezial-Detektionssystem gute Ergebnisse.

Zuletzt wird die Koexpression durchgeführt. Hierfür wird LANA nach dem Standardprotokoll nachgewiesen. Im Anschluss erfolgt der Nachweis von p21 unter Verwendung verschiedener Konzentrationen des Primärantikörpers. Die Färbung erfolgt mit AEC für LANA und mit Vector blue[®] für p21. Die Konzentration des Primärantikörpers für p21 ergibt bei 1:50 ein gut auswertbares Ergebnis. Das Protokoll ist in der Tabelle 3 zusammengefasst.

6.1.4 Etablierung der Koexpression von LANA mit CD31 und LANA mit CD34

CD31 und CD34 werden auf TRS6-Puffer (30' Mikrowelle) unter Verwendung des APAAP-Maus-Detektionssystems mit einer Konzentrationsreihe von 1:10 bis 1:100 für CD31 und 1:30 bis 1:300 für CD34 ausgetestet.

In der Koexpression konnte bei CD31 mit einer Verdünnung 1:30 ein gutes Ergebnis erzielt werden. Als Chromogen wird Fast red verwendet, das mit DAB⁺ für den Nachweis von LANA einen guten Kontrast ergibt. Für CD34 konnte bei einer Verdünnung von 1:100 ebenfalls mit Fast red[®] ein gut auswertbares Ergebnis erzielt werden.

Primär-antikörper	Versuchte Verd./VM	Versuchte Inkub.-Parameter	AP-Kits HRP-Kits + HCl-Block	Versuchte Farben	Resultat: Verdünnung/Farben
LANA	1:100 – 1:8000/DM	60' RT	APAAP-Rat	Fast red	Kein Erfolg
	1:100 – 1:10 ⁴ /DM	60' RT	ABC-Rat	AEC, AEC+, DAB+, DAB(Kupfer), DAB(Cobalt)	1:1000 gut (alle Farben)
CD31	1:10 – 1:100/RM	60' RT	APAAP-Maus	Fast red	1:30 gut (Fast red 10')
CD34	1:50 – 1:300/RM	60' RT	APAAP-Maus	Fast red	1:50 gut (Fast red 10')
Ki67	1:50 – 1:150/DM	60' RT	APAAP-Maus	Fast red, Vect. blue, BCIP/NBT	1:80 gut (Vector blue 9')
p21	1:10 – 1:100/DM	60' RT	APAAP-Maus APAAP-spez.	Vector blue, BCIP/NBT	1:50 gut (Vector blue 9')

Tabelle 2: Gelungene Umstellungsversuche der Parameter der Primärantikörper der Monoexpression, so dass ein Koexpressionsversuch mit LANA möglich wird (Abkürzungen: s. Abkürzungsverzeichnis).

1. Primärantikörpernachweis			2. Primärantikörpernachweis			
Parameter für 1. Prim.-AK	1. Prim.-AK	Chromogen	2. Prim.-AK	Verd./VM/ Inkub.	Detektions-Kit	Chromogen
Vorbehandlung: TRS6 30' Blockierung: H ₂ O ₂ Verd./VM: 1:8000/DM Inkubationszeit: 60' RT: Detektionskit: ABC-Ratte	LANA	DAB+ 10'	CD31	1:30/RM/ 60' RT	APAAP-Maus	Fast red 10'
		DAB+ 10'	CD34	1:100/RM/ 60' RT	APAAP-Maus	Fast red 10'
		AEC+ 10'	Ki67	1:80/DM/ 60' RT	APAAP-Maus	Vector blue 10'
		AEC+ 10'	p21	1:50/DM/ 60' RT	APAAP-spez.	Vector blue 10'

Tabelle 3: Parameter der Koexpressionsversuche mit LANA, die ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt haben.

6.1.5 Weiterführende Koexpressionsversuche mit LANA

Bei immunhistochemischen Versuchen an Paraffinmaterial ist der Nachweis des Primärantikörpers nicht mit jedem beliebigen Detektionssystem möglich, ohne dass es hierfür einen plausiblen Grund gibt. Beispielsweise gelang der Nachweis von LANA nicht mit einem APAAP-Detektionssystem. Trotz ausführlicher Versuche gelang es bei

einigen Antikörpern nicht, in der Koexpression mit LANA auswertbare Ergebnisse zu erzielen. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Koexpressionsversuche und das Spektrum der Austestung dieser Versuche erwähnt werden, um für nachfolgende Versuche als Grundlage zu dienen.

P53 konnte mit keinem APAAP-Detektionssystem erkannt werden. Aus diesem Grund wird es auf dem LSAB-Detektionssystem belassen, die beiden HRP-Detektionssysteme werden mit einem HCL-Blockierungsschritt (0,1n; 10') voneinander getrennt. Zur Anfärbung wurde für p53 AEC+ {braun} verwendet, für LANA Vector sg {schwarz} (Vectastain). Das Resultat ist von der Qualität nicht gut genug, um die gesamte Serie auszuwerten. In einzelnen Präparaten lässt sich eine Korrelation von p53 und LANA erkennen.

Bei der Austestung der folgenden Antikörper gelang es nicht, eine auswertbare immunhistochemische Koexpression mit LANA zu erzielen, weil die Umstellung des Versuchsprotokolls auf ein anderes Detektionssystem bzw. andere Vorbehandlungsmaßnahmen nicht gelang. Ausgetestet wurden monoklonale Antikörper, die gegen die Proteine bax, Rb, casp-p, casp-3, bcl_{XL} und bcl-2 gerichtet sind.

In der folgenden Tabelle sind alle Parameter der einzelnen Umstellungsversuche für Koexpressionen aufgelistet.

Primär-antikörper	Versuchte Verd./VM	Versuchte Inkub.-Parameter	AP-Kits HRP-Kits + HCL-Block	Versuchte Farben	Resultat: Verdünnung/Farben
BAX	1:10 – 1:200/DM	60' RT	APAAP-Maus APAAP-spez. ENV-HRP	Fast red 10' AEC 10'	Umstellung auf AP-System gelingt nicht 1:100, mit HCL-Block kein gutes Ergebnis
BCL-2	1:10 – 1:20/DM	60' RT, 37°C 120' RT	APAAP-spez. ENV-HRP	Fast red 10' AEC 10'	Umstellung auf AP-System gelingt nicht Mit HCL-Block kein gutes Resultat
BCL-XL	1:10 – 1:50/RM	60' RT	APAAP-spez. ENV-HRP	Fast red 18' AEC 10', Nova Red	Umstellung auf AP-System gelingt mit einem mangelhaften Ergebnis Kein gutes Resultat mit HRP-System und HCL-Block
P53	1:10 – 1:100/ RM o. DM	60' RT, 37°C 120' RT 22h 4°C	APAAP-Maus APAAP-spez. LSAB, Env-HRP	Fast red 10' AEC 10' Vector Sg, Vector VIP, NovaRed,	Umstellung auf AP-System gelingt nicht mäßiges Resultat mit 1:100 /RM, LSAB, HCL-Block, Vector Sg

Tabelle 4: Austestungen, bei denen Umstellungsversuche der Standardprotokolle nicht gelangen, so dass Koexpressionsversuche mit LANA nicht möglich waren (Abkürzungen: s. Abkürzungsverzeichnis).

6.1.6 Etablierung des Nachweises von LANA am Sektionsmaterial

Für die Austestung des Primärantikörpers für LANA am Sektionsmaterial werden Kaposi-Sarkome aus Sektionsfällen anhand des üblichen Standardprotokolls für den Nachweis von LANA an Exzisaten getestet. Die Konzentration des Primärantikörpers muss hierfür ausgetestet werden. Es zeigt sich unter einer stärkeren Konzentration des Primärantikörpers von 1:1000 im Vergleich zur gewöhnlichen Konzentration von 1:8000, die an den diagnostischen Exzisaten gewählt wurde, eine vergleichbare Anfärbung.

6.2 Ergebnisorientierter Teil der etablierten Experimente

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der durchgeführten Experimente am Kollektiv dargestellt. Verwendet wurden die im technischen Teil ermittelten Protokolle.

6.2.1 Quantifizierung der LANA-positiven Zellen im Kaposi-Sarkom

Für die Bestimmung der LANA-positiven und der LANA-negativen Teilmengen wird eine Monoexpression von LANA durchgeführt. Die Präparate werden mit einem Zählraster (Zeiss-Okular, Jena) in einer 400-fachen Vergrößerung ausgezählt. Die ausgezählte Fläche entspricht $625\mu\text{m}^2$. In jedem Präparat werden fünf Areale ausgezählt. Gezählt werden LANA-positive Zellkerne und LANA-negative Zellkerne. Aus diesen Werten wird das Verhältnis ermittelt, indem der Quotient von LANA-positiven Zellen zur Zahl der Gesamtzellkerne gebildet wird.

Aus dem Ergebnis kann ermittelt werden, wie hoch der Anteil von HHV 8-infizierten Zellen in Abhängigkeit des KS-Stadiums ist (Abbildung 2). Außerdem kann eine Korrelation zwischen der Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld und den LANA-positiven Zellen aufgestellt werden.

6.2.1.1 Frühstadium

Im Frühstadium konnten 18 Präparate ausgewertet werden. Davon kann in zwei Fällen (11 %) kein LANA nachgewiesen werden. In vier Fällen (22 %) können weniger als 10 % LANA-positive Zellen gezählt werden. In sieben Fällen (39 %) können zwischen 10 und 20 % LANA-positive Zellkern gezählt werden. In drei Fällen (17 %) sind zwischen 20 und 30

% der Zellen LANA-positiv. In zwei Fällen (11 %) zwischen 30 und 40 %. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich für das Frühstadium des Kollektivs gemittelt ein Anteil von 14 % ($s = 10\%$) LANA-positive Zellen.

6.2.1.2 Spätstadium

Im Spätstadium können 20 Präparate ausgewertet werden. Davon können in 11 Fällen (55 %) zwischen 70 und 80 % LANA-positive Zellkerne gezählt werden. In zwei Fällen (10 %) werden zwischen 80 und 90 % LANA-positive Zellkerne ermittelt, in drei Fällen (15 %) zwischen 60 und 80 %. In vier Fällen (20 %) werden weniger als 60 % LANA-positive Zellen ermittelt. Im Kollektiv konnten demnach im Spätstadium gemittelt 68 % LANA-positive Zellkerne ermittelt werden ($s = 11\%$).

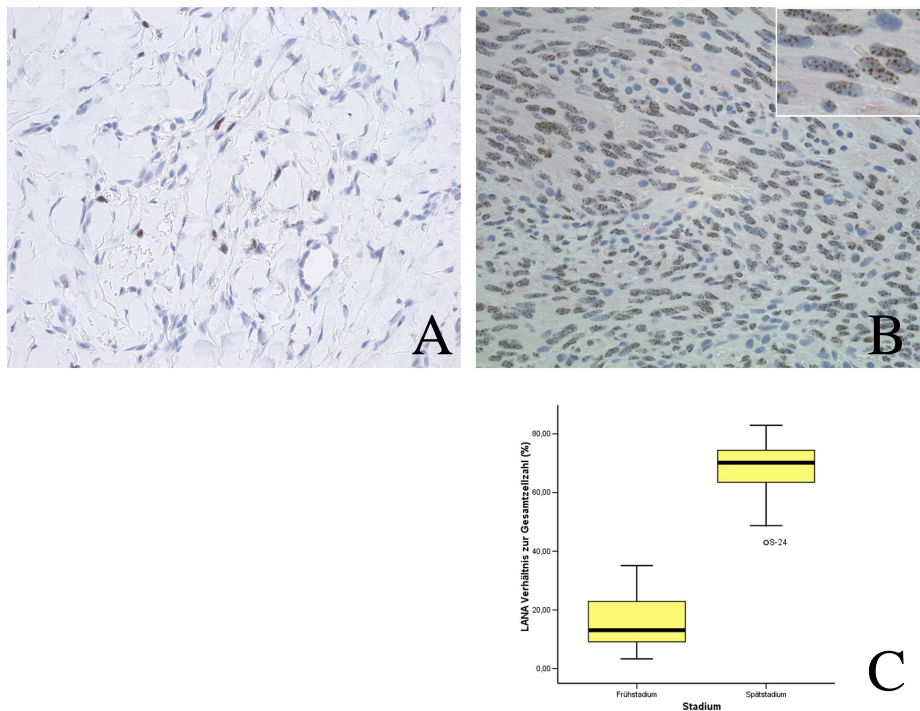


Abbildung 2: Zeigt die immunhistochemische Expression von LANA im KS exemplarisch im Frühstadium (A) und im Spätstadium (B) sowie das Ergebnis dargestellt als Boxplot (C).

6.2.2 Zelldichte des Kaposi-Sarkoms im Früh- und Spätstadium

Anhand der Ermittlung der Gesamtzellmenge aus dem Versuch der Quantifizierung von LANA kann die mittlere Zelldichte für das Kollektiv festgestellt werden. Im Frühstadium beträgt die Zelldichte im Mittel 336 Zellen/mm² (das sind 210 Zellen pro 625 µm²). Im Spätstadium beträgt sie 632 Zellen/mm² (das sind 395 Zellen pro 625 µm²). Im Spätstadium des KS befinden sich also im Schnitt etwa doppelt so viele Zellen auf gleichem Raum wie im Frühstadium.

6.2.3 Ergebnisse der Koexpression Ki67 mit LANA

Mit diesem Experiment können Aussagen getroffen werden, in welchem Maß sich LANA-positive Zellen in einer aktiven Phase des Zellzyklus befinden. Außerdem kann ermittelt werden, wie hoch der Anteil der proliferierenden LANA-positiven Zellen an der Gesamtzahl der proliferierenden Zellen ist (Abbildung 3).

6.2.3.1 Frühstadium (LANA⁺/Ki67⁺ bezogen auf LANA)

Im Frühstadium konnten 18 Fälle ausgewertet werden.

In 7 Fällen (39 %) sind keine Zellen nachweisbar, die sowohl Ki67 als auch LANA exprimieren (LANA⁺/Ki67⁺).

In 7 Fällen (39 %) liegt der Teil der LANA⁺/Ki67⁺, bezogen auf alle LANA-positiven Zellen, im Intervall 0 % bis 5 %.

In 3 Fällen (17 %) liegt der Anteil der LANA⁺/Ki67⁺ Zellen, bezogen auf alle LANA-positive Zellen, im Intervall 5 % bis 10 %.

In einem Fall sind 12,5 % der LANA⁺/Ki67⁺-Zellen positiv.

Gemittelt ergibt sich für das angiomatoide Stadium des KS ein Anteil an LANA⁺/Ki67⁺-Zellen, bezogen auf alle LANA-positive Zellen, von 2,7 % (s = 3,7 %).

6.2.3.2 Spätstadium (LANA⁺/Ki67⁺ bezogen auf LANA)

Im Spätstadium sind 20 KS-Fälle ausgewertet worden.

In 14 Fällen (70 %) liegt der Anteil der LANA⁺/Ki67⁺, bezogen auf alle LANA-positiven Zellen, im Intervall 0 % bis 5 %.

In 4 Fällen (20 %) liegt der Anteil der LANA⁺/Ki67⁺, bezogen auf alle LANA-positiven Zellen, im Intervall 5 % bis 10 %.

In 2 Fällen (10 %) liegt der Anteil der LANA⁺/Ki67⁺, bezogen auf alle LANA-positiven Zellen, im Intervall 10 % bis 20 %.

Gemittelt ergibt sich für das sarkomatoide Stadium des KS ein Anteil an LANA⁺/Ki67⁺ Zellen, bezogen auf alle LANA-positiven Zellen, von 5,4 % (s = 4,4 %).

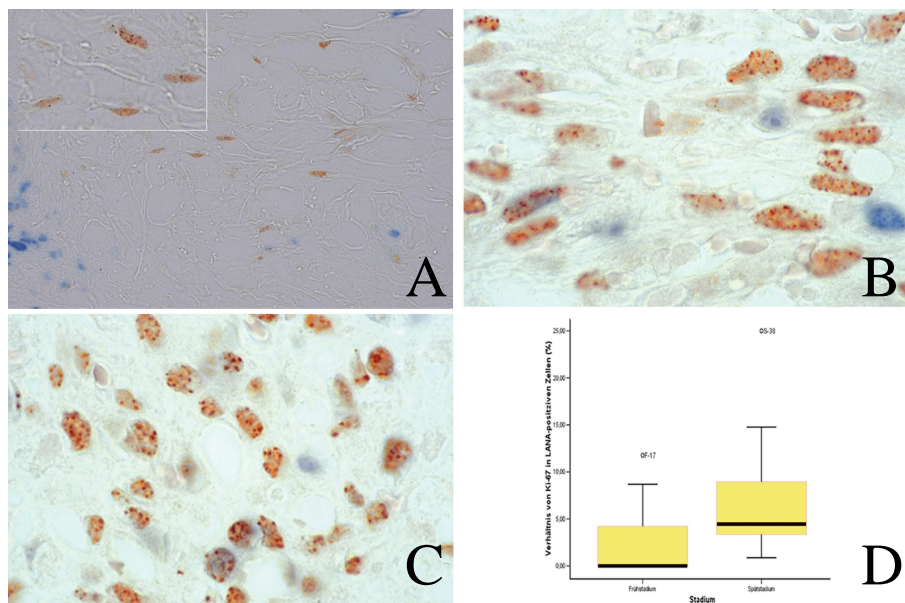


Abbildung 3: Koexpression von LANA mit Ki67: Frühstadium (A), Spätstadium (B,C) sowie die Darstellung als Boxplot (D).

6.2.3.3 Frühstadium (LANA⁺/Ki67⁺ bezogen auf Ki67)

In 7 Fällen (39 %) sind keine Zellen nachweisbar, die sowohl Ki67 als auch LANA exprimieren (LANA⁺/Ki67⁺).

In 2 Fällen (11 %) liegt der Anteil der LANA⁺/Ki67⁺-Zellen, bezogen auf Ki67⁺, im Intervall 0 % bis 5 %.

In 3 Fällen (17 %) liegt der Anteil der LANA⁺/Ki67⁺-Zellen, bezogen auf Ki67⁺, im Intervall 5 % bis 10 %.

In 3 Fällen (17 %) liegt der Anteil der LANA⁺/Ki67⁺-Zellen, bezogen auf Ki67⁺, im Intervall 10 % < x ≤ 20 %.

In einem Fall sind 26,9 % LANA⁺/Ki67⁺-Zellen positiv bezogen auf Ki67⁺.

Gemittelt ergibt sich für das angiomatoide Stadium ein Anteil von 6,5 % (s = 7,7 %) der LANA⁺/Ki67⁺-Zellen an der Proliferationsfraktion.

6.2.3.4 Spätstadium (LANA⁺/Ki67⁺ bezogen auf Ki67)

In 2 der 20 auswertbaren Fälle (10 %) liegt der Anteil der LANA⁺/Ki67⁺-Zellen, bezogen auf totalKi67⁺, im Intervall 10 % bis 15 %.

In 10 Fällen (50 %) liegt der Anteil der LANA⁺/Ki67⁺-Zellen, bezogen auf Ki67⁺, im Intervall 15 % bis 20 %.

In 5 Fällen (25 %) liegt der Anteil der LANA⁺/Ki67⁺-Zellen, bezogen auf Ki67⁺, im Intervall 20 % bis 25 %.

In 2 Fällen (10 %) liegt der Anteil der LANA⁺/Ki67⁺ Zellen, bezogen auf Ki67⁺, im Intervall 25 % bis 30 %.

In einem Fall (5 %) liegt der Anteil der LANA⁺/Ki67⁺-Zellen, bezogen auf Ki67⁺, im Intervall 30 % bis 35 %.

Gemittelt ergibt sich für das sarkomatoide Stadium ein Anteil von 20,4 % (s = 5,6 %) der LANA⁺/Ki67⁺ Zellen an der Proliferationsfraktion.

6.2.4 Ergebnisse der Koexpression für LANA mit p21^{waf1/cip1}

Ziel der Betrachtung ist die Ermittlung des Verhältnisses der LANA-positiven Zellen, die p21^{waf1/cip1} exprimieren (LANA⁺/p21⁺), bezogen auf die Gesamtzahl der LANA-positiven Zellen (Abbildung 4).

6.2.4.1 Frühstadium

Insgesamt konnten 17 Fälle im angiomatoiden Stadium des KS ausgewertet werden.

In 8 Fällen (47 %) liegt der Anteil der LANA⁺/p21⁺, bezogen auf die LANA⁺-Zellen, im Intervall von 80 % bis 100 %.

In 7 Fällen (41 %) liegt der Anteil der LANA⁺/p21⁺-Zellen, bezogen auf die LANA⁺-Zellen, im Intervall von 60 % bis 80 %.

In einem Fall beträgt der Anteil 58 %, in einem weiteren 20%.

Gemittelt ergibt sich für das angiomatoide Stadium ein Anteil an LANA⁺/p21⁺-Zellen von 80,2 % (s = 19,6 %).

6.2.4.2 Spätstadium

Insgesamt konnten 19 Fälle im sarkomatoiden Stadium des KS ausgewertet werden.

In 13 Fällen (68 %) liegt der Anteil der LANA⁺/p21⁺-Zellen, bezogen auf die LANA⁺-Zellen, im Intervall von 80 % bis 100 %.

In 5 Fällen (26 %) liegt der Anteil der LANA⁺/p21⁺-Zellen, bezogen auf die LANA⁺-Zellen, im Intervall von 40 % bis 60 %.

In einem Fall beträgt der Anteil 37,4 %.

Gemittelt ergibt sich für das sarkomatoide Stadium ein Anteil an

LANA⁺/p21⁺-Zellen von 79,9 % (s = 22,7 %).

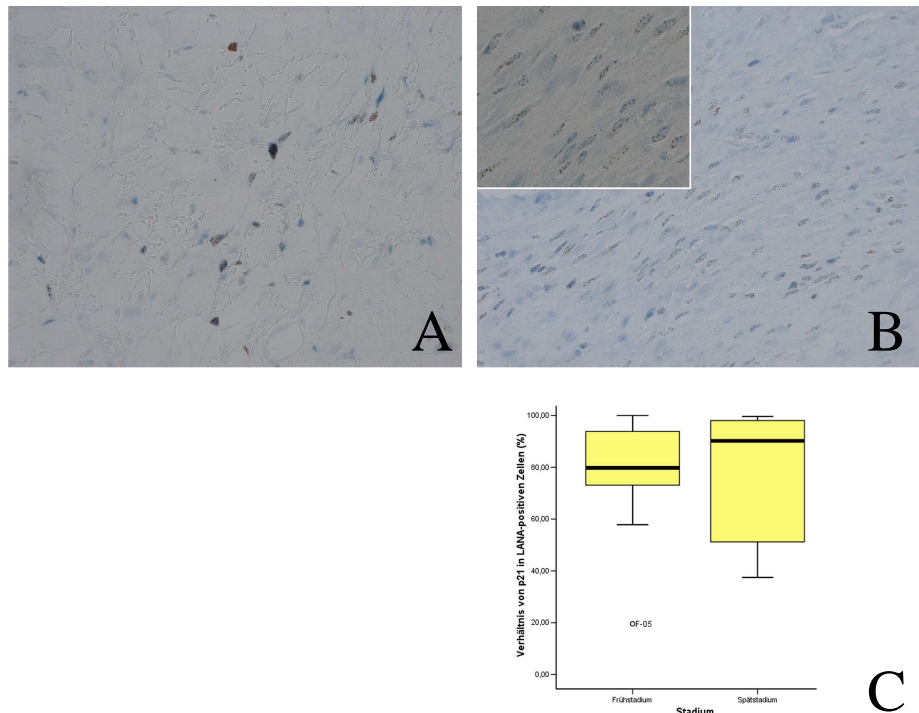


Abbildung 4: Zeigt die Koexpression von LANA mit p21: Im Frühstadium (A) und im Spätstadium (B) sowie die Darstellung der Ergebnisse als Boxplot (C).

6.2.5 Ergebnisse der Koexpression von LANA mit CD31

Ziel der Betrachtung ist die Ermittlung der Anteils von LANA-positiven Zellen, die in Abhängigkeit des Stadiums CD31 exprimieren (Abbildung 5).

6.2.5.1 Frühstadium

In der Koexpression von LANA mit CD31 wurden 11 Fälle des angiomatoiden Stadiums untersucht. In drei Fällen (27 %) sind alle LANA-positiven (LANA⁺) Zellen auch CD31-positiv (CD31⁺).

In 5 Fällen (45 %) liegt der Anteil der LANA⁺/CD31⁺-Zellen im Intervall von 80 % bis 100 %.

In 3 Fällen beträgt der Anteil der LANA⁺/CD31⁺-Zellen 20 %, 23 % sowie

45 %.

Gemittelt ergibt sich aus den Ergebnissen, dass 77 % ($s = 31,5$ %) der LANA⁺-Zellen CD31 exprimieren.

6.2.5.2 Spätstadium

In der Koexpression von LANA mit CD31 wurden im sarkomatoiden Stadium 15 Fälle untersucht. In 5 Fällen (33 %) sind alle LANA-positiven Zellen auch CD31-positiv (CD31⁺).

In 6 Fällen (40 %) liegt der Anteil der LANA⁺/CD31⁺-Zellen im Intervall von 80 % bis 100 %.

In 4 Fällen liegt der Anteil der LANA⁺/CD31⁺-Zellen bei 77 %, 42 %, 32 % sowie 27 %.

Gemittelt ergibt sich aus den Ergebnissen, dass 81 % ($s = 25,6$ %) der LANA⁺-Zellen CD31 exprimieren.

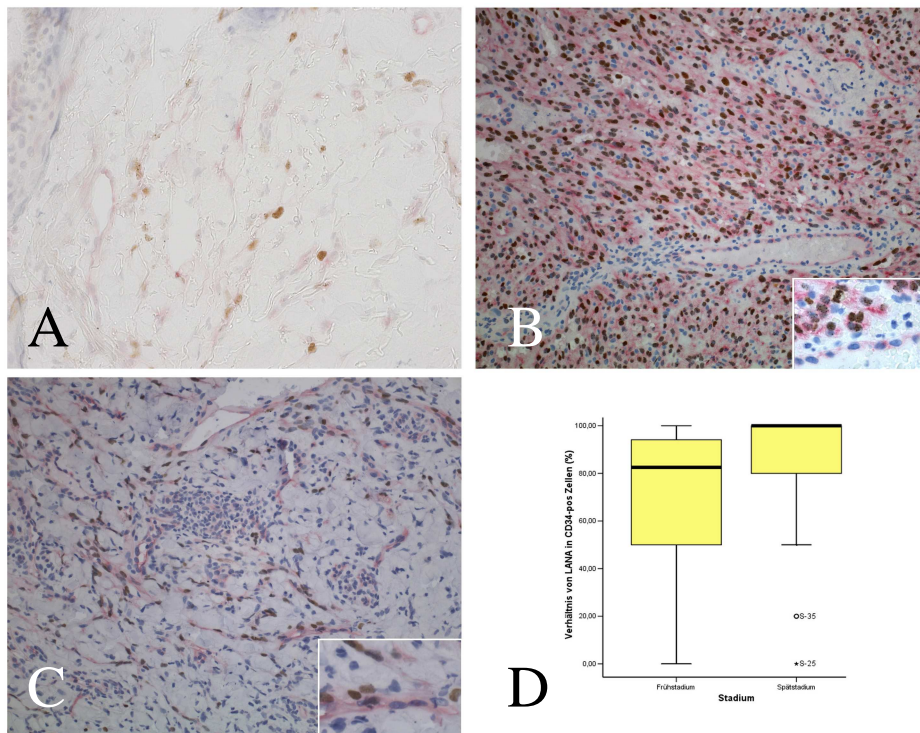


Abbildung 5: Zeigt die Koexpression von LANA mit CD31: Im Frühstadium (A), im Spätstadium (B,C) sowie die Darstellung der Ergebnisse als Boxplot (D).

6.2.6 Ergebnisse der Koexpression von LANA mit CD34

Mit diesem Experiment lässt sich der Anteil von LANA-positiven Zellen ermitteln, die CD 34 exprimieren (Abbildung 6)

6.2.6.1 Frühstadium

In der Koexpression von LANA mit CD34 sind im angiomatoiden Stadium 18 Fälle des Kollektivs auswertbar.

In 4 Fällen (22 %) sind alle LANA-positiven Zellen CD34-positiv.

In 7 Fällen (39 %) liegt der Anteil der LANA⁺/CD34⁺-Zellen im Intervall von 80 % bis 100 %.

In 4 Fällen (22 %) liegt der Anteil der LANA⁺/CD34⁺-Zellen im Intervall von 60 % bis 80 %.

In 3 Fällen ist der Anteil der LANA⁺/CD34⁺-Zellen bei je 50 %, 30 % sowie 12 %. In einem Fall konnte LANA nicht nachgewiesen werden.

Gemittelt ergibt sich aus den Ergebnissen, dass 74,3 % (s = 30,8 %) der LANA⁺-Zellen CD34 exprimieren.

6.2.6.2 Spätstadium

In der Koexpression von LANA mit CD34 konnten im sarkomatoiden Stadium 20 Fälle ausgewertet werden.

Davon sind in 12 Fällen (60 %) alle LANA-positiven Zellen CD34-positiv.

In 4 Fällen (20 %) liegt der Anteil der LANA⁺/CD34⁺-Zellen im Intervall von 80 % bis 100 %.

In einem Fall liegt der Anteil der LANA⁺/CD34⁺-Zellen bei 50 % und in 2 Fällen bei 20 %. In einem Fall konnte LANA nicht nachgewiesen werden.

Gemittelt ergibt sich aus den Ergebnissen für das sarkomatoide Stadium, dass 85,3 % ($s = 26,3$ %) der LANA⁺-Zellen CD34 exprimieren.

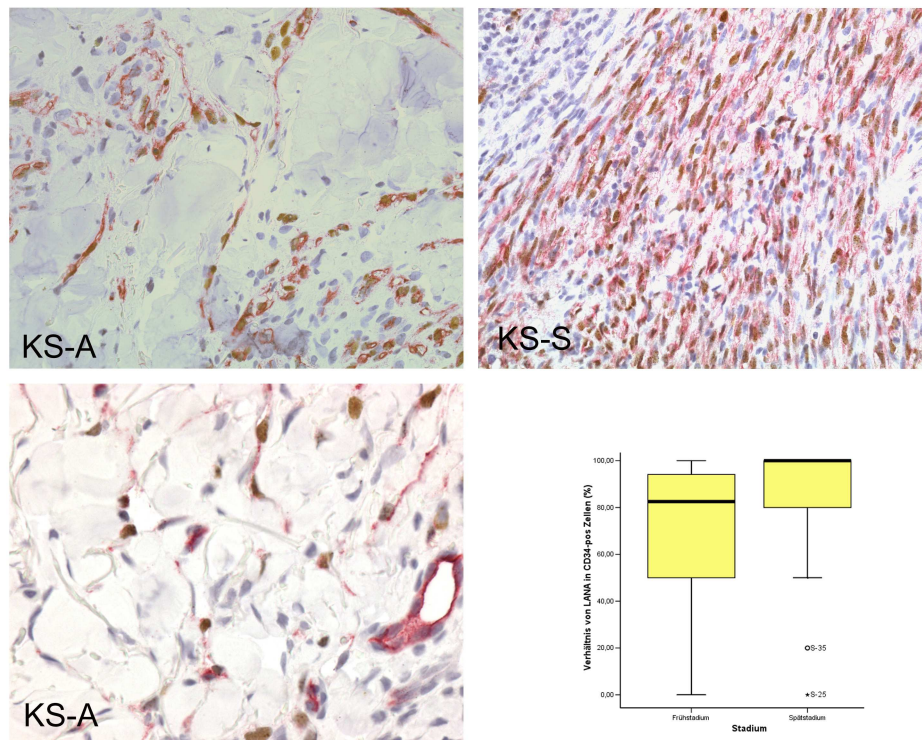


Abbildung 6: Zeigt die Koexpression von LANA mit CD34: Im Frühstadium (KS-A) und Spätstadium (KS-S) sowie dargestellt als Boxplot.

6.2.7 Deskriptive Analyse der Ergebnisse von LANA mit CD31 und CD34

In den Koexpressionen von LANA mit den Endothelzellmarkern CD31 und CD34 fallen unter Berücksichtigung der Expression und der Morphologie Eigenschaften des KS auf, die im Folgenden erwähnt werden sollen.

6.2.7.1 Gefäßstruktur der Spindelzellen im Spätstadium

In der Koexpression von LANA mit CD31 und CD34 werden auf Grund des luminalen Expressionsmusters der Antigene Zellverbände zwischen Spindelzellen sichtbar, die Ähnlichkeit mit Gefäßen haben oder sogar

Gefäßen entsprechen. Häufig finden sich hier auch intraluminale Erythrozyten und Leukozyten (Abbildung 7).

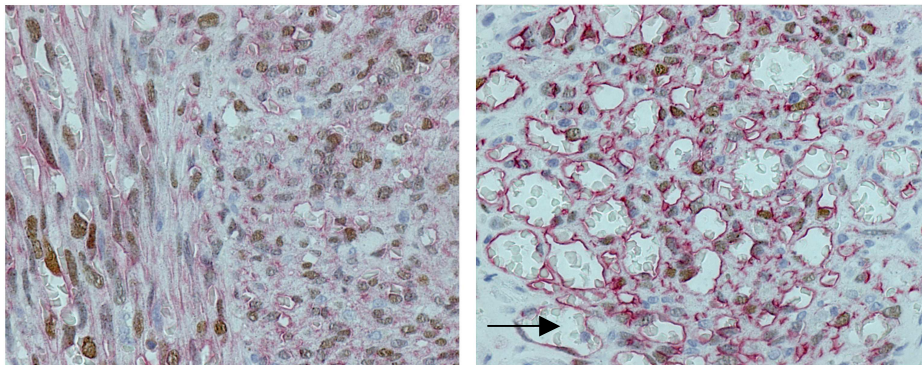


Abbildung 7: Zeigt gefäßähnliche Strukturen in der Koexpression von LANA mit CD34, die teilweise intraluminale Erythrozyten und auch Leukozyten aufweisen (s.Pfeil).

6.2.7.2 Expression von LANA in Gefäßendothelzellen- eine qualitative Analyse

Unabhängig von den Gefäßstrukturen, die in den Spindelzellverbänden auffallen, können im Gesamtkollektiv Beobachtungen an ausgereiften infizierten Gefäßen durchgeführt werden, die Hinweise liefern könnten, ob HHV 8 Blutendothelzellen oder Lymphendothelzellen infiziert. Eine quantitative Analyse ist hierbei nicht möglich, da es sich um einzelne Beobachtungen handelt. Im Folgenden sind die Beobachtungen zusammengefasst dargestellt. Sie lassen sich exemplarisch an den Bildern in Abbildung 8 nachvollziehen.

CD34-positive Arterien, in denen der dreischichtige Wandaufbau deutlich zu erkennen ist, sind im KS meist LANA-negativ (Abbildung 8A). LANA-negative Gefäße können von LANA-positiven Zellen komplett umgeben sein (Abbildung 8A,C). Unabhängig von der Menge an LANA-positiven Zellen in der Umgebung lassen sich LANA-positive Endothelzellen in Arterien (Abbildung 8B) und anderen großen Gefäßen (Abbildung 8D,E) nachweisen, die alle CD34 exprimieren. LANA-positive Zellen im lockeren Zellverband, ohne Nachweis einer gefäßähnlichen Struktur,

exprimieren dagegen kein CD34 (Abbildung 8F). Zudem sind Gefäße aufgefallen, die sowohl LANA-positive als auch LANA-negative Zellen aufweisen. Die LANA-positiven Zellen dieser Gefäße exprimieren immer CD34. Die LANA-negativen Zellen zeigen im Vergleich zu den LANA-positiven Zellen keine oder nur eine sehr geringe Expression von CD34 (Abbildung 8G,H).

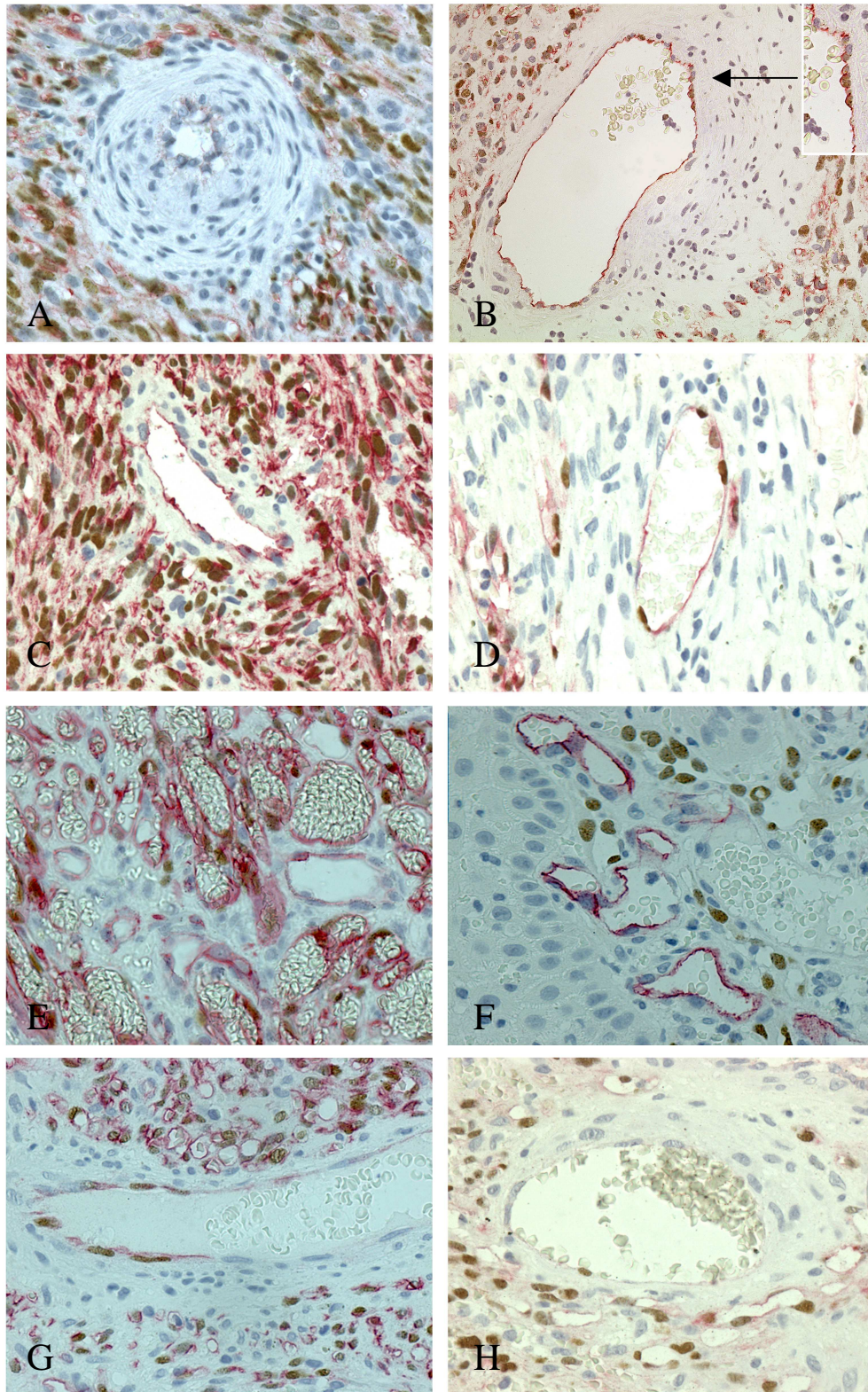


Abbildung 8: Zeigt exemplarisch die Beobachtung von Gefäßen im KS in Bezug auf die Expression von LANA und CD34. A: LANA-negative Arterie. B: Mehrere LANA-positive Zellen in einer Arterie. C: LANA-negatives Blutgefäß. D: LANA-positives Blutgefäß. E: LANA-positive und -negative Gefäße mit intravasalen Erythrozyten. F: LANA-positive lockere Zellverbände neben CD34-positiven Gefäßen. G und H: Blutgefäße, die sowohl LANA-positive als auch LANA-negative Endothelzellen besitzen.

6.2.8 Zusammenfassung der Ergebnisse an KS-Biopsaten

Im Folgenden sind die gemittelten Ergebnisse der immunhistochemischen Experimente zusammengefasst.

Stadium des Kaposi-Sarkoms		LANA (%)	Ki67 ⁺ LANA ⁺ zu LANA (%)	Ki67 ⁺ LANA ⁺ zu Ki67 (%)	p21 ⁺ LANA ⁺ zu LANA (%)	CD31 ⁺ LANA ⁺ zu LANA (%)	CD34 ⁺ LANA ⁺ zu LANA (%)
Angiomatoides Frühstadium	Mittelwert:	13,9	2,7	6,5	80,2	76,5	74,3
	Standardabw.:	10,4	3,7	7,7	19,7	31,5	30,8
Sarkomatoides Spätstadium	Mittelwert:	67,8	5,4	20,4	79,9	80,6	85,3
	Standardabw.:	11,1	4,4	5,6	22,7	25,6	26,3

Tabelle 5: Zeigt die gemittelten Werte der einzelnen immunhistochemischen Experimente.

6.2.9 Ergebnisse von LANA am Sektionsmaterial

In den 24 untersuchten Fällen von Sektionen liegt stets ein Kaposi-Sarkom als Positivkontrolle vor. Es wird gezielt nach vereinzelt LANA-positiven Zellen in verschiedenen Geweben gesucht, die keine räumliche Beziehung zum Kaposi-Sarkom aufwiesen. Hierbei wird Lymphknoten, Lunge, Milz und Leber untersucht.

6.2.9.1 Nachweis von LANA in Lymphknoten

In 17 Fällen konnte Lymphknotengewebe (LK) untersucht werden. Davon war in 8 Fällen ein KS mit LANA-positiven Zellen im LK nachweisbar. In drei Fällen (Sek. 19, 20, 21) zeigten sich LANA-positive mononukleäre Zellen, ohne Hinweis auf ein KS in der Umgebung.

6.2.9.2 Nachweis von LANA in der Lunge

Von den 20 untersuchten Exzisaten der Lunge war in sechs Fällen ein KS mit LANA-positiven Zellen nachweisbar. In drei Fällen (Sek. 7, 20, 21) zeigten sich vereinzelte LANA-positive mononukleäre Zellen ohne Hinweis auf ein KS (Abbildung 9).

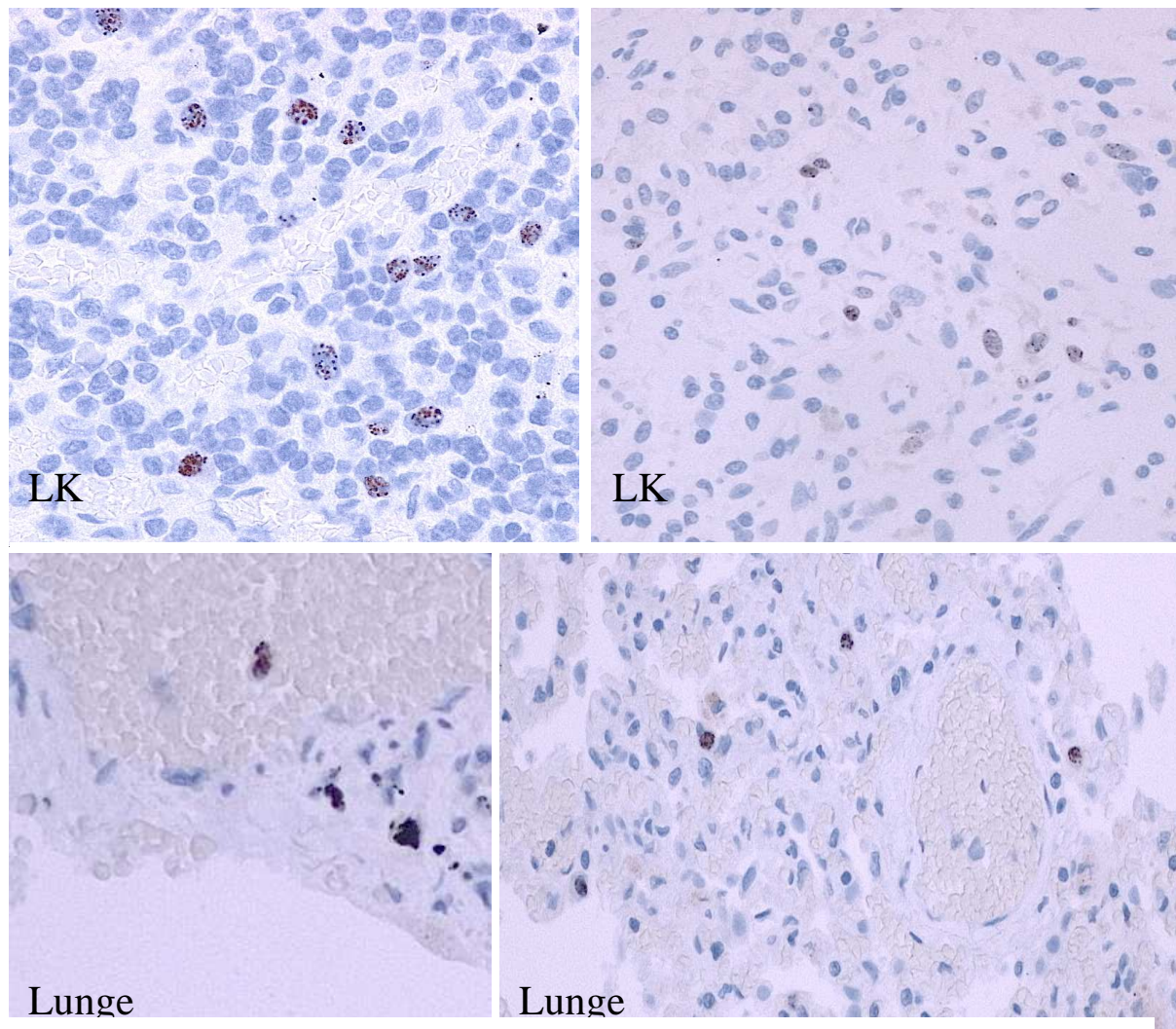


Abbildung 9: Zeigt den Nachweis einzelner LANA-positiver Zellen in Lymphknoten- (LK) und Lungengewebe.

6.2.9.3 Nachweis von LANA in der Milz

Von den 18 Milzpräparaten, die untersucht wurden, zeigte sich in einem Fall ein KS. In acht Fällen waren LANA-positive mononukleäre Zellen in der weißen Pulpa nachweisbar ohne Hinweis auf ein KS (Abbildung 10).

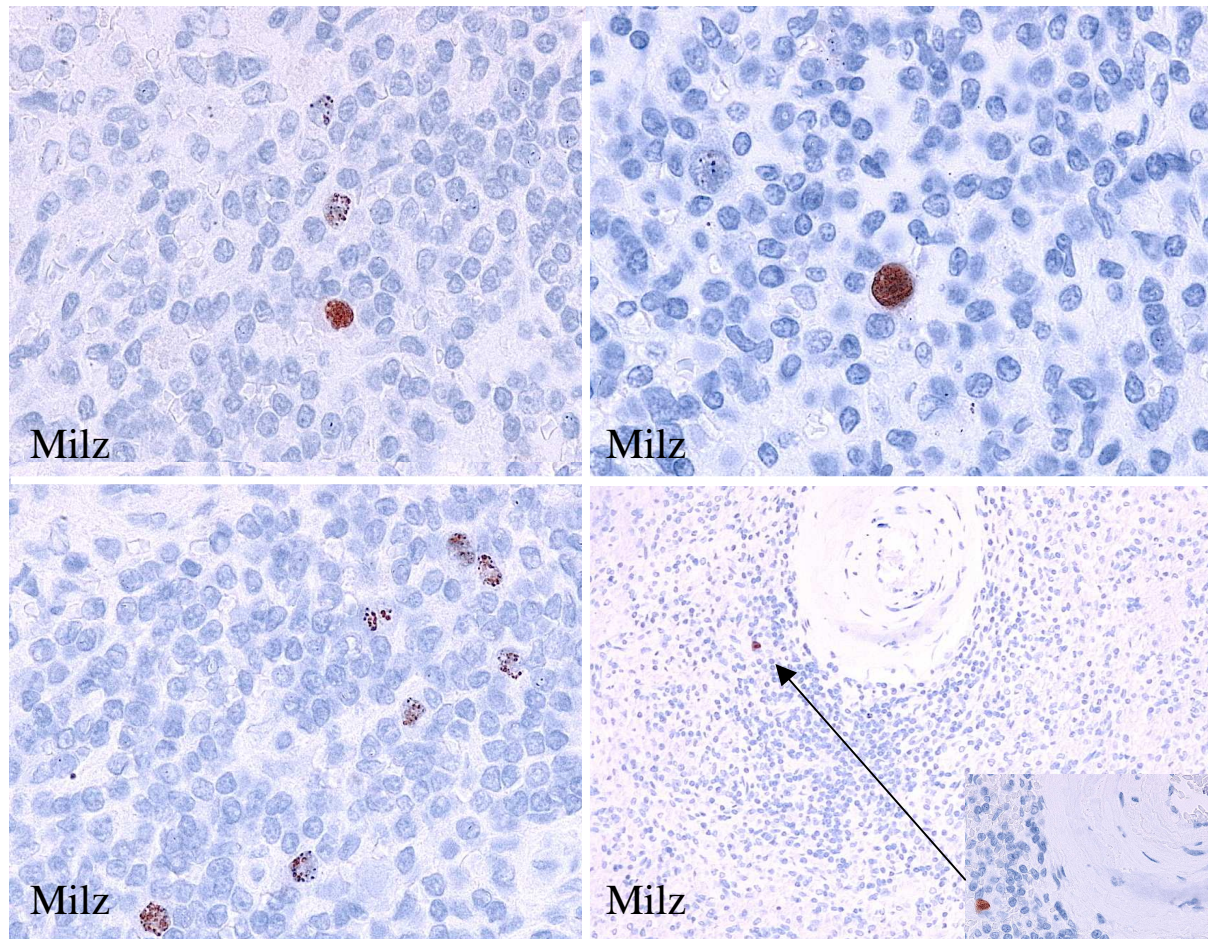


Abbildung 10: Zeigt den Nachweis von vereinzelt LANA-positiven Zellen in der Milz.

6.2.9.4 Nachweis von LANA in der Leber

Von den 18 untersuchten Leberpräparaten zeigten sich in drei Fällen (Sek. 7, 9, 20) vereinzelte LANA-positive mononukleäre Zellen ohne Hinweis auf ein KS. Dabei war in einem Fall eine LANA-positive Zelle aufgefallen, die sich in der Mitose befindet (Abbildung 11).

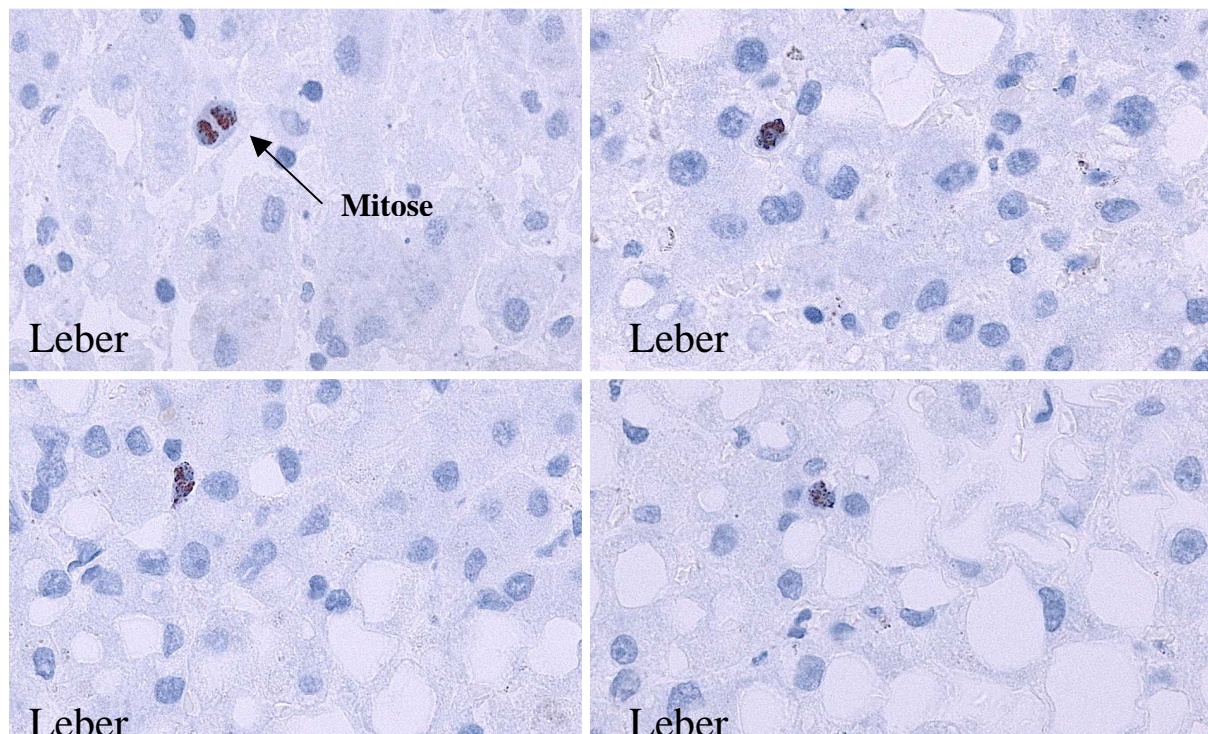


Abbildung 11: Zeigt den Nachweis einzelner LANA-positiver Zellen in der Leber.

6.2.9.5 Zusammenfassung der Ergebnisse des Sektionsmaterials

Bei den 21 Sektionen konnte in allen makroskopisch diagnostizierten KS LANA nachgewiesen werden. In 15 Fällen fielen Kaposi-Sarkome auf, obwohl makroskopisch kein KS vermutet wurde. In 16 Fällen ohne mikroskopischem KS, konnten vereinzelte LANA-positive Zellen nachgewiesen werden. Dabei entfallen 3 Präparate auf Lymphknoten, 3 auf die Lunge, 7 auf die Milz und 2 auf die Leber. Die genaue Verteilung ist der Tabelle 8 im Anhang zu entnehmen.

7 Diskussion

In den letzten Jahrzehnten haben Erkenntnisse über die virale Onkogenese wesentlich zum Verständnis der Physiologie des Zellzyklus und der Apoptose im Allgemeinen und der molekularen Onkologie im Besonderen beigetragen. Obwohl bereits 1972, hundert Jahre nach der Erstbeschreibung durch Moritz Kaposi (Kaposi 1872), im KS der Nachweis von „herpesähnlichen“ Partikeln gelang (Giraldo 1972), kam der wissenschaftliche Durchbruch auf diesem Gebiet erst 20 Jahre später mit dem Nachweis viraler DNA-Fragmente, die Homologien zu Herpesviren-DNA aufwiesen (Chang 1994). Dies führte schließlich zur Entdeckung des Kaposi-Sarkom-assoziierten Herpesvirus, das formal als Humanes-Herpes-Virus 8 (HHV 8) bezeichnet wird (Boshoff 1995).

Mittlerweile wurde auf diesem Gebiet viel veröffentlicht. Dennoch bleiben viele Fragen bezüglich der viralen Pathogenese von HHV 8, die bisher nicht hinreichend geklärt sind.

Wie gelangt das Virus vom Infektionsort zur Zielzelle des KS?

Welche ist die primäre Zielzelle von HHV 8 im KS?

Wie ist die Entwicklung infizierter Zellen im Verlauf von Früh- zum Spätstadium des KS, liegen sie vereinzelt oder in einem Zellverband vor?

Wie hoch ist der Anteil von infizierten Zellen in Abhängigkeit des Stadiums?

Geht die Proliferation im KS von infizierten oder womöglich von nicht-infizierten Zellen aus und wie verhält sich die Proliferationskinetik im KS, verglichen mit der anderer HHV-8-assoziiierter Erkrankungen?

Problematisch waren bisher Erörterungen in Bezug auf diese Fragestellungen, weil HHV 8 im Gewebsverband bzw. an *Ex-vivo*-

Material immunhistochemisch nicht nachzuweisen war. Mit der Etablierung eines kommerziell erhältlichen, stabilen Antikörpers gegen das virale „Latenz-assoziiertes-nukleäres Antigen“ (LANA) von HHV 8 änderte sich diese Ausgangsposition grundlegend, weil hiermit infizierte Zellen sicher von nicht-infizierten Zellen unterschieden werden können.

In dieser Arbeit wird das KS mittels immunhistochemischer Detektion von LANA im AIDS-assoziierten KS untersucht, um einen Beitrag zur Klärung der genannten Fragestellungen zu liefern. Hierbei wurden immunhistologische Untersuchungen an Obduktions- und Exzisionsmaterial von insgesamt 61 Patienten mit HIV-assoziiertem KS durchgeführt. Dazu mussten technische Vorbedingungen geschaffen werden. Zunächst war der immunhistochemische Nachweis von LANA an die Verhältnisse des Obduktionsmaterials anzupassen. Außerdem folgten umfangreiche Testreihen zur Etablierung von Doppeldirektionsexperimenten, die bis dato nicht beschrieben, aufgrund der Zellvielfalt im KS zur Differenzierung infizierter und nicht-infizierter Zellen jedoch unabdinglich waren.

Im Folgenden werden Ergebnisse zur Quantifizierung von LANA in den verschiedenen Stadien des KS, der Dissemination von LANA-positiven Zellen im menschlichen Organismus und zur Koexpression mit Zellmarkern und einzelnen Leitproteinen von Proliferation bzw. Zellzyklus vorgestellt und diskutiert.

Zur Erörterung der Dissemination von HHV 8, wie also HHV 8 zur Zielzelle des KS gelangt, wurde Sektionsmaterial von 21 Obduktionen auf vereinzelte HHV-8-positive Zellen in diversen Geweben untersucht (s. 7.1).

Für die Untersuchung von Fragestellungen, die direkt das KS betreffen, dient ein Kollektiv aus insgesamt 40 Exzisionen, das aus 20 Frühstadien

und 20 Spätstadien des KS besteht. Zum Fragenkomplex der primären Zielzelle von HHV 8 im KS wurden Koexpressionsversuche mit LANA und den Endothelzellmarkern CD31 und CD34 durchgeführt (s. 7.2).

Zur genauen Quantifizierung des Anteils von HHV 8-positiven Zellen im KS wurde eine Auszählung LANA-positiver Zellen in Abhängigkeit des Stadiums durchgeführt und diese auf die Gesamtzellzahl und zusätzlich auf die Zelldichte bezogen (s. 7.3).

Zum Größenwachstum bzw. zur Proliferationskinetik des KS wurden Koexpressionen von LANA mit Ki67 und p21 durchgeführt und die Ergebnisse mit den Eigenschaften anderer HHV 8 assoziierter Erkrankungen verglichen (s. 7.4).

Die Ergebnisse dieser Experimente werden nachfolgend in gesonderten Unterkapiteln diskutiert, jeweils mit dem Versuch einer Einordnung in den aktuellen Kenntnisstand der formalen Genese des KS.

7.1 Dissemination mononukleärer LANA-positiver Zellen

Bisher unklar ist, wie HHV 8 vom Infektionsort zu der Zielzelle gelangt, die der Ausgangspunkt für die Entstehung eines KS ist. HHV 8 wird überwiegend sexuell (Martin 1998), am ehesten orogenital übertragen (Melbye 1998, Brambilla 2000, Dukers 2000, Osmond 2002). Ein Charakteristikum des KS ist die häufig zeitgleiche multifokale Manifestation. Demnach muss vor der Entstehung des KS eine Dissemination von HHV 8 im Organismus vorliegen. Die Entstehung eines KS an bestimmter Stelle hängt von Co-Faktoren ab. Ein wichtiger Co-Faktor im AIDS-assoziierten KS ist das HIV-1 selbst bzw. dessen Proteine (Stürzl 2001). Theoretisch denkbar ist die Dissemination von freien Virionen. Die Affinität von HHV 8 gegenüber B-Lymphozyten ist im

Blut durch den Nachweis viraler DNA in CD19-positiven B-Zellen in AIDS-assoziierten KS-Patienten mehrfach belegt worden (Ambroziak 1995, Mesri 1996). Demnach sind die Dissemination und das Erreichen der Zielzelle durch infizierte B-Zellen neben der Virämie ein möglicher Mechanismus.

Ob infizierte mononukleäre Zellen auch *in situ* vorliegen und im Interstitium zu finden sind, ist bisher noch nicht an einem größeren Kollektiv untersucht worden. Hierfür wurde in dieser Arbeit der immunhistochemische Nachweis von LANA am Obduktionsmaterial etabliert. Anhand eines Kollektivs von insgesamt 21 Sektionsfällen von HIV-Patienten mit mindestens einem KS konnten unterschiedliche Gewebe (Lymphknoten, Lunge, Leber und Milz) untersucht werden. Hierbei zeigten sich häufig mikroskopisch kleine Kaposi-Sarkome. Außerdem konnten in mehreren Präparaten vereinzelte mononukleäre Zellen im Interstitium nachgewiesen werden, die sich nicht in örtlicher Beziehung zu einem KS befinden. In 8 Präparaten der Milz konnten LANA-positive mononukleäre Zellen in der weißen Pulpa nachgewiesen werden sowie in drei Lymphknoten. Aber auch in nicht-lymphatischem Gewebe konnte HHV 8 immunhistochemisch nachgewiesen werden. So fanden sich vereinzelte LANA-positiven mononukleäre Zellen im Interstitium von drei Lungenpräparaten und zwei Leberpräparaten.

Demnach könnten HHV-8-infizierte mononukleäre Zellen eine Rolle in der Pathogenese des KS spielen, indem sie das Virus zu der Zielzelle des KS transportieren. Ein weiterer Hinweis für die Bedeutung von infizierten „Trägerzellen“ in der Pathogenese des KS konnte in einer Arbeit von Barozzi et al. gefunden werden. Es wurden organtransplantierte Frauen untersucht, deren Spender Männer waren und die im Verlauf ein iatrogenes KS entwickelten. In den HHV-8-infizierten Zellen konnte mehrfach Y-chromosomale DNA nachweisen

werden, die offenbar von dem Spender abstammt (Barozzi 2003). In diesen Fällen muss HHV 8 durch Trägerzellen aus dem Transplantat des Organspenders in den Empfänger gelangt sein.

Das iatrogene KS tritt mit einer Inzidenz von 0,5 % bis 5,3 % auf (Antman 2000). Meist ist die Ursache eine Reaktivierung von persistierenden latenten Viren. Luppi et al. konnte an serologischen Studien von 50 Fällen zeigen, dass in 16 Fällen (32 %) HHV 8 vom Spender übertragen wurde (Luppi 2003). Somit könnte die Transfektion durch infizierte Trägerzellen bei Organtransplantationen eine klinische Relevanz besitzen.

Demzufolge ist denkbar, dass es nach der Transfektion zu einer Infektion von B-Zellen kommt. Nach der Primärinfektion persistiert das Virus in B-Lymphozyten möglicherweise über Jahrzehnte in der latenten Phase. Immunsuppressive Bedingungen, wie sie bei AIDS oder im Falle einer Organtransplantation vorliegen, begünstigen die Reaktivierung der latent-infizierten Zelle. Co-Faktoren, wie HIV-1 im AIDS-assoziierten KS, führen über Chemokine zu einer Invasion der infizierten B-Zelle in das Interstitium. Die B-Zelle wird aktiviert, das Virus geht von der latenten in die lytische Phase mit der Synthese von parakrinen Proteinen und Virionen über. Die parakrinen Proteine aktivieren potentielle Zielzellen von HHV 8. Anschließend führt die Lyse der B-Lymphozyten zur Freisetzung viraler Proteine und Virionen, die die Infektion der aktivierten Zielzelle des KS zu Folge haben. Welche die eigentliche Zielzelle des KS ist, wird im folgenden Abschnitt dargestellt.

7.2 Untersuchung zur endothelialen Zielzelle im KS

Seit der Erstbeschreibung des KS besteht Uneinigkeit über die Histogenese des KS. Nach dem derzeitigen Stand der Forschung wird

angenommen, dass das KS von Endothelzellen abstammt, obwohl es auch Marker von anderen Zelltypen exprimiert (Dupin 1999, MacPhail 1996). Bisher ist noch nicht geklärt, ob es sich bei den Endothelzellen, die durch HHV 8 infiziert werden, um Lymphendothelien (LEC), Blutendothelien (BEC), beide Zelltypen oder Vorläuferzellen der beiden Zelllinien handelt.

Zur Erörterung dieser Fragestellung wurden Koexpressionen von LANA mit den Endothelzellmarkern CD31 und CD34 durchgeführt. Sie dienen der gezielten Betrachtung LANA-positiver Zellen in Bezug auf ihr Expressionsverhalten. Neben der quantitativen Analyse des Experiments sind in den Versuchen Unterschiede der Expression in Abhängigkeit von der Morphologie aufgefallen, was in Form einer deskriptiven Analyse in diesem Abschnitt diskutiert werden soll.

7.2.1 Nachweis von CD31 und CD34 in LANA-positiven Zellen und Gefäßen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass von der überwiegenden Anzahl der LANA-positiven Zellen und unabhängig vom Stadium sowohl CD31 als auch CD34 exprimiert wird. Dieses Expressionsmuster ist für Blutendothelzellen (BEC), unreifen Lymphendothelzellen (LEC) oder Vorläuferzellen typisch. In einer Arbeit von Wang et al. konnte *in vitro* gezeigt werden, dass HHV 8 das Expressionsmuster der infizierten Zelle verändert (Wang 2004). In dem verwendeten Modell zeigt sich eine Veränderung des Expressionsmusters von infizierten LEC mit typischen BEC-Markern. In diesem Modell konnte CD34 in infizierten LEC nicht nachgewiesen werden, was mit der kurzen Infektionszeit von Wang begründet wird (persönliche Korrespondenz mit Wang 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, dass mit HHV 8 infizierte BEC ihr

Expressionsmuster in Richtung LEC verändern (Hong 2004). Daraus ergibt sich, dass HHV 8 sowohl BEC als auch LEC *in vitro* infizieren kann. Außerdem scheinen die infizierten Zellen ihr Expressionsmuster so zu verändern, dass sie der anderen Zellreihe ähnlich werden (Flore 2004). In den hier dargestellten Ergebnissen an *Ex-vivo*-Material zeigt sich ein Expressionsmuster, das bei endothelialen Vorläuferzellen zu erwarten wäre, sie stützen somit die Annahme, dass HHV 8 das Expressionsmuster der infizierten Zelle in Richtung einer endothelialen Vorläuferzelle verändert.

Einzelne Beobachtungen dieses Experimentes verdeutlichen, dass HHV 8 ausgereifte Gefäße infiziert. Die Beobachtungen sind exemplarisch in der Abbildung 8 zusammengefasst. Meist sind ausgereifte Gefäße im KS LANA-negativ. Allerdings fallen auch größere Gefäße mit LANA-positiven Endothelzellen auf. Die hier nachgewiesenen LANA-positiven Gefäße exprimieren CD34. Es sind auch Gefäße aufgefallen, die nur teilweise LANA-positiv sind. Die LANA-positiven Zellen dieser Gefäße exprimieren ebenfalls CD34, hingegen scheinen die LANA-negativen Zellen dieser Gefäße weniger CD34 zu exprimieren. Der Unterschied im CD34-Expressionsmuster der nur teilweise infizierten Gefäße könnte auf eine Änderung des Expressionsmusters durch die Infektion, wie sie von Wang et al. *in vitro* nachgewiesen wurde, hinweisen.

Mit Ausnahme von einigen wenigen Zellen, die in einem lockeren Zellverband ohne deutliche Gefäßstruktur vorliegen (Abbildung 8F), exprimieren alle LANA-positiven Zellen CD34. Demnach hängt die Expression von CD34 in LANA-positiven Zellen möglicherweise von der Ausbildung eines Gefäßzellverbandes ab.

7.2.2 Betrachtungen zum Zellverband im KS

Im angiomatoiden Frühstadium zeigen sich im KS Gefäße, die im Gegensatz zu regulären Gefäßen dilatiert und unregelmäßig geformt sind. Sie besitzen dünnere Wände mit flachen Endothelzellen und haben Ähnlichkeit mit Granulationsgewebe (Gottlieb und Ackermann 1988). Im Spätstadium hingegen imponieren in den histologischen Standardfärbungen eher synzytiale Verbände von Spindelzellen, die interzelluläre spaltförmige Lumina aufweisen, sogenannte „slit-like vessels“, in denen häufig Erythrozyten zu finden sind.

Anhand der immunhistochemischen Koexpression von LANA mit den Endothelzellmarkern CD31 und CD34 lassen sich morphologische Besonderheiten der Spindelzellverbände des KS erkennen. Da die Marker die luminale Membran anfärben, wird die Struktur der Zellverbände besser sichtbar. Im Spätstadium des KS werden mit dieser Methode Lumina sichtbar, die morphologisch Gefäßen entsprechen. Bei unterschiedlicher Schnittführung durch die Zellverbände ist zu erkennen, dass im Längsschnitt lineare und im Querschnitt zirkuläre Strukturen sichtbar werden. Außerdem zeigen sich intraluminale Erythrozyten und Leukozyten, in den von CD34-positiven Zellmembranen ausgekleideten Gefäßen (Abbildung 7). Der Diameter der Lumina ist unterschiedlich. Häufig kann in Querschnitten nur ein Zellkern nachgewiesen werden, dessen Zelle das Gefäßlumen ausbildet.

Diese Beobachtung zeigt, dass im Spätstadium des KS von den Spindelzellen strukturierte kapilläre Gefäße gebildet werden, wie es auch im angiomatoiden Frühstadium der Fall ist. Möglicherweise führt auf Grund der zunehmenden Zelldichte der steigende Druck des Gewebes zu einer Kompression der Gefäßstrukturen, so dass die typische morphologische Anordnung der Spindelzellen in Form eines synzytialen

Zellverbandes entsteht. Demnach sind die Tumorzellen des KS unabhängig vom Stadium an der Bildung von Gefäßen beteiligt, wie es beim Angiosarkom der Fall ist. Damit unterscheiden sie sich von anderen Tumoren, wie z.B. Karzinomen oder Fibrosarkomen, bei denen zwischen den nicht-neoplastischen Tumorgefäßen die Tumorzellen proliferieren.

7.3 Differenzierung der HHV-8-infizierten und nicht-infizierten Zellen des KS mit LANA

Grundlegend für weitere Betrachtungen zu den oben genannten Fragestellungen sind der Nachweis und die Quantifizierung von LANA im Kollektiv. Das Kaposi-Sarkom ist ein inhomogener Tumor, in dem neben den tumorspezifischen Spindelzellen verschiedene Zelltypen anzutreffen sind. Zu ihnen gehören Gefäßendothelien, Lymphozyten, Monozyten, Mastzellen, neutrophile Granulozyten und Bindegewebszellen (Ensoli 1998, Blasig 1997, Ganem 1998). Auf Grund der Inhomogenität ist nicht eindeutig, welche Zellen des KS direkt oder indirekt an der Tumorgenese beteiligt sind. Mit dem immunhistochemischen Nachweis von LANA kann zwischen LANA-positiven infizierten Zellen und LANA-negativen Zellen unterschieden werden.

Im Frühstadium wird LANA im untersuchten Kollektiv, bezogen auf die Gesamtmenge der Zellen, zu 14 % ($s = 10$ %) exprimiert. Im Spätstadium beträgt der Anteil von LANA-positiven Zellen 68 % ($s = 11$ %). Aus diesem Ergebnis geht hervor, dass LANA im Verlauf des KS zunehmend exprimiert wird. Stellt man eine Korrelation zwischen LANA-positiven Zellen und der Gesamtzellzahl auf, wird deutlich, dass mit zunehmender Zelldichte bzw. Gesamtzellzahl auch der Anteil der LANA-positiven Zellen steigt und der Übergang zwischen Früh- und Spätstadium fließend ist (Abbildung 12). Dies erklärt die hohen

Standardabweichungen des Experiments. Sie ist durch die stufenlos progrediente Entwicklung des KS bedingt. Somit ist anzunehmen, dass die Stadieneinteilung einem Modell entspricht, das dem kontinuierlichen Wachstum des KS nicht Rechnung trägt.

In zwei Fällen des angiomatoiden Frühstadiums (KS 10, KS 18) konnte LANA nicht nachgewiesen werden, obwohl anhand der Morphologie ein KS diagnostiziert wurde. Hierbei handelt es sich möglicherweise um ein sehr frühes Stadium des KS, in dem LANA noch nicht exprimiert wird.

Andere Arbeitsgruppen kommen zu Ergebnissen, bei denen die Expression von LANA im Frühstadium zwischen 10 % und 30 % und im Spätstadium über 90 % liegt (Dupin 1999, Katano 1999, Katano 2000). Allerdings wurden die Ergebnisse durch Schätzungen ermittelt und nicht, wie hier, ausgezählt.

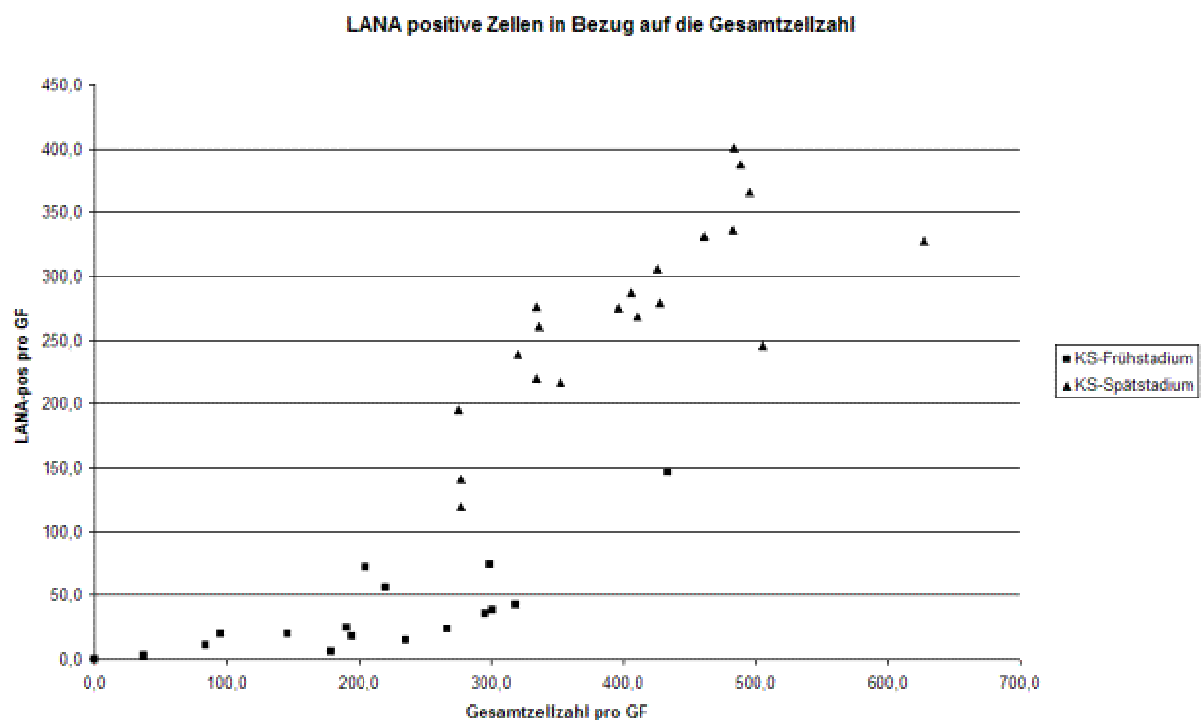


Abbildung 12: Korelation zwischen Gesamtzellzahl und LANA-positiver Zellen in Abhängigkeit des Stadiums im Kaposi-Sarkom (Frühstadium als Vierecke, Spätstadium als Dreiecke dargestellt; GF = Gesichtsfeld).

7.4 Diskussion der Dignität HHV-8-assoziiierter Erkrankungen

In der folgenden Diskussion soll anhand der Koexpressionsversuche von LANA mit Ki67 und p21 die Proliferation im Kaposi-Sarkom näher beurteilt werden. In Zusammenschau des derzeitigen Standes der Forschung wird in einem Modell dargestellt, wie gewisse Faktoren an der Pro- bzw. Regression des KS beteiligt sind. In den danach folgenden zwei Abschnitten werden bezüglich der Dignität Vergleiche zu den anderen beiden HHV-8-assoziierten Erkrankungen, dem Primary effusion Lymphom (PEL) und dem multizentrischen Typ des Morbus Castleman (MCD), gezogen.

7.4.1 Beurteilung der Proliferation im Kaposi-Sarkom

Die Uneinigkeit über die Dignität des Kaposi-Sarkoms lässt sich bis zu dessen Erstbeschreibung durch Moritz Kaposi im Jahre 1872 zurückverfolgen. Bis heute ist nicht geklärt, ob es sich bei dem KS um eine reaktive Proliferation handelt, um eine monoklonale Erkrankung oder um eine stadienabhängige Entwicklung, die von einer reaktiven Proliferation zu einer monoklonalen Erkrankung verläuft. Zur Klärung dieser Frage ist es wichtig, mehr über die proliferativen Eigenschaften im KS zu erfahren.

Anhand von immunhistochemischen Koexpressionen von LANA und Schlüsselproteinen des Zellzyklus kann die Proliferationskinetik von LANA-positiven und LANA-negativen Zellen des KS differenziert betrachtet werden. Diesbezüglich wurde in dieser Arbeit LANA mit dem Proliferationsmarker Ki67 und mit dem Cyklinkinase-Inhibitor p21 koexprimiert.

Bei dieser Koexpression wird deutlich, dass nur ein geringer Teil der

LANA-positiven Zellen Ki67 exprimiert. Im Frühstadium sind es 2,7 %, im Spätstadium 5,4 %. Der Anteil der LANA-positiven proliferierenden Zellen im KS, bezogen auf die Gesamtmenge der proliferierenden Zellen, ist ebenfalls gering. Im Frühstadium sind nur 6,5 % aller proliferierenden Zellen LANA-positiv, im Spätstadium sind es hingegen 20,4 %. Daraus lässt sich schließen, dass im KS mehr LANA-negative als LANA-positive Zellen proliferieren, obwohl im Verlauf eine Zunahme der LANA-positiven proliferierenden Zellen vorliegt.

Anders verhält es sich mit dem Nachweis von p21 im KS. Die Koexpression zeigt, dass in beiden Stadien zirka 80 % der LANA-positiven Zellen p21 exprimieren. Aus der geringen Proliferation und der starken Expression von p21 kann man schließen, dass sich ein Großteil der LANA-positiven Zellen in einem p21-abhängigen Zyklusarrest befindet. Diese Ergebnisse werden in anderen Arbeiten bestätigt. Demnach konnte in einem anderen Kollektiv ein geringer Anteil von Ki67-exprimierenden Zellen unter den LANA-positiven Zellen nachgewiesen werden (Payakurel 2004). Weitere Hinweise für eine geringe Proliferation in den Spindelzellen sind eine äußerst geringe Mitoserate der Spindelzellen (Hong 2002) und flowzytometrische Untersuchungen, die einen geringen Teil von Spindelzellen in der S- oder G2-Phase im KS finden (Bisceglia 1992, Kaaya 2000).

Auf der Basis der hier ermittelten Ergebnisse und unter Berücksichtigung des derzeitigen Stands der Forschung ist ein Modell denkbar, das die Einflussnahme von HHV 8 in der Regulation des Zellzyklus im KS zu erklären versucht. Im folgenden soll dieses Modell erläutert werden.

7.4.1.1 Proliferation nicht-infizierter Zellen im KS

Lytisch infizierte Zellen setzen vor dem Zelluntergang, der zu einer

massiven Freisetzung von Virionen führt, parakrine Proteine frei. Zu diesen gehören vGPCR, vMIP 1-3 und vIL 6. Sie haben sowohl proliferative, angiogenetische als auch selektiv-chemoattraktive Eigenschaften auf benachbarte Zellen. Sofern sich diese Zellen nicht im Zyklusarrest befinden, können sie sich unter dem Einfluss dieser mitogenen Stimuli teilen. Wir gehen davon aus, dass diese Proteine benachbarte, nicht-infizierte Zellen aktivieren, um eine darauffolgende Infektion mit den freien Virionen, die durch die Lyse der infizierten Zelle freigesetzt werden, zu ermöglichen.

Bei Immunkompetenz verhindern anti-virale Faktoren die Aktivierung der benachbarten Zellen. Ein Beispiel ist der Einfluss von IFN- α im KS, der bereits im Kapitel 3.6.3 erläutert wurde.

Immundefizienz, beispielsweise durch einen IFN-Rezeptordefekt (Camicioglu 2004), Chemotherapie nach Organtransplantation oder eine HIV-Infektion, begünstigt die Progredienz des KS, indem die benachbarten Zellen an der Aktivierung nicht gehindert werden können.

7.4.1.2 Proliferation infizierter Zellen im KS

Die proliferierenden infizierten Zellen müssen gesondert betrachtet werden. Wir konnten zeigen, dass ein geringerer Anteil von LANA-positiven Zellen im Vergleich zu den LANA-negativen Zellen proliferiert. Im Spätstadium, also im vortgeschrittenen Verlauf der Erkrankung, nimmt der Anteil proliferierender LANA-positiver Zellen zu. Welchen Einfluss latente virale Proteine, wie vCyc und LANA, auf den Zellzyklus infizierter Zellen haben, ist unklar. Aufgrund des geringen Anteils proliferierender infizierter Zellen gehen wir davon aus, dass beide Proteine nicht zu einem autonom ablaufenden Zellzyklus führen. Im folgenden Abschnitt wird diese Annahme begründet und in Abbildung 13

schematisch dargestellt.

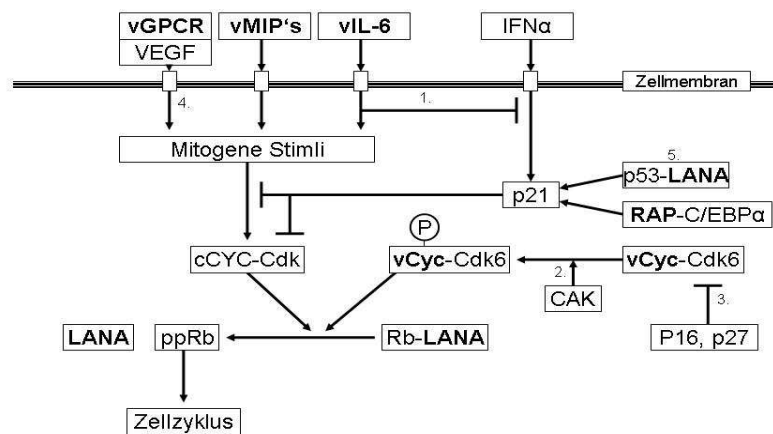
Das virale Protein vCyc ist nur gering in den infizierten Zellen nachweisbar (Canell 1999). Es aktiviert die Zelle nur in einem p53^{-/-}-Knockout Modell (Verschuren 2002). Eine Expression von vCyc in anderen Zellen führt dagegen zu einer Akkumulation von p53 mit nachweisbarem Zyklusarrest und Apoptose (Ojala 1999, Ojala 2000, Verschuren 2002, Verschuren 2004). Im KS akkumuliert p53 allerdings und ist funktionsfähig (Katano 2001). Außerdem scheinen im KS Mutationen im p53-Gen keine Rolle zu spielen (Scinicariello 1997, Zietz 1998b).

Unter welchen Bedingungen eine infizierte Zelle proliferiert, bleibt unklar. Es konnte aber gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung des vCyc-cdk6-Komplexes durch die zelluläre cyclinaktivierende Kinase (CAK) hierfür nötig ist. Außerdem werden weitere zelluläre Cyclin-Cdk-Komplexe benötigt, um einen Zellzyklus zu induzieren, an dem vCyc beteiligt ist (Ellis 1999, Mann 1999, Jeffrey 2000, Kaldis 2001, Child 2001).

LANA interagiert mit der hypophosphorylierten Form des Retinoblastoma Proteins (Rb) (Radkov 2000). Wie bereits in Kapitel 3.5.1.4 erläutert, gehen wir davon aus, dass diese Interaktion keine Zelltransformation bewirkt. Erst ein mitogener Stimulus, der zu einer Hyperphosphorylierung von Rb mit konsekutiver Dissoziation von LANA, aktiviert die Zelle.

Zusammenfassend gehen wir davon aus, dass in den infizierten Zellen des KS kein unkontrollierter Zellzyklus vorliegt, wie er bei Tumorzellen nachgewiesen werden kann. Möglicherweise ist von einer viral kontrollierten Zellzyklusregulation auszugehen. LANA könnte demzufolge die Zellproliferation durch die Interaktion mit Rb sogar

verhindern und erst die Dissoziation der Proteine könnte die Proliferation ermöglichen, bei der vCyc dann eine Rolle in der Progression des Zellzyklus spielen könnte.



1. Chatterjee 2002; 2. Child 2001; 3. Kaldis 2001, Child 2001, Swanton 1997; 4. Bais 1998, Yang 2000; 5. Friborg 1999

Abbildung 13: Zeigt die Abhängigkeit der Progression des Zellzyklus von viralen Proteinen des HHV 8. Unter welchen Umständen es zur Progression kommt, hängt von den viralen, zellulären und extrazellulären parakrinen Bedingungen ab.

7.4.2 Differenz im Expressionsmuster von KS und Primary Effusion Lymphoma (PEL)

Sowohl das Kaposi-Sarkom (KS) als auch das Primäre Effusionslymphom (PEL) sind HHV-8-assoziierte Erkrankungen, deren infizierte Zellen sich zu über 90 % in der latenten Phase befinden und LANA-positiv sind (Staskus 1997, Zhong 1996). Bezüglich der Expression der untersuchten proliferativen Faktoren zeigen sich bei beiden Erkrankungen deutliche Differenzen, die hier erwähnt werden sollen. Der Anteil von p21-exprimierenden latenten Zellen im PEL liegt unter 5 % (Wu 2002). Im Vergleich exprimieren 80 % der infizierten Zellen des Kaposi-Sarkoms p21. Ki67 wird dagegen im PEL in über 90 % der Zellen exprimiert (Carbone 2000, O'Donnovan 2001), im KS sind

es weniger als 6 % der infizierten Zellen.

Dieser Vergleich zeigt, dass im KS andere proliferative Bedingungen vorherrschen als im PEL. Möglich wäre, dass beim PEL das Gleichgewicht zwischen regressiven und progressiven Faktoren stark zu Gunsten der progressiven Faktoren verschoben ist, so dass der Zellzyklus im PEL quasi unkontrolliert ablaufen kann, dagegen im KS der Zyklus regulativen Mechanismen unterliegt.

Die Regulation des Zellzyklus ist stark von den Cyklinkinase-Inhibitoren (CKI) abhängig. Die Dysfunktion der CKI's und speziell von p16 im PEL ist für die Zyklusprogression infizierter Zellen wichtig. Verschuren et al. konnten zeigen, dass eine Dysfunktion im p53-Signalübertragungsweg für die komplette G1/S-Transition des Zellzyklus unter Einfluss des viralen Cyclins (vCyc) von HHV 8 notwendig ist (Verschuren 2002, Verschuren 2004). Außerdem konnten Platt et al. zeigen, dass eine ektope Expression von p16 in PEL-Zelllinien einen Zyklusarrest induzieren kann (Platt 2002). Demnach wäre möglich, dass die Dysfunktion von p16^{INK4a} und p14^{ARF} im PEL zusammen mit dem Einfluss von vCyc einen autonom ablaufenden Zellzyklus bewirkt.

Untersuchungen zu diesem Thema stehen noch aus. So ist bisher unklar, ob der Verlust von p16 in vCyc-transfizierten Zellen ähnliche Folgen aufweist wie der Verlust von p53 oder p14. Außerdem wäre interessant, ob eine ektope Expression von p21 in latent infizierten Zellen der PEL-Zelllinien einen Zyklusarrest induzieren kann, wie es Platt et al. für p16 zeigen konnten (Platt 2002).

Die Ergebnisse könnten das pathogenetische Pendant zu den Differenzen der oben beschriebenen Expressionsmuster zwischen KS und PEL darstellen. Im PEL führt eine Störung der Zykluskontrolle durch Funktionsverlust von CKI's (p16, p21) sowie p14^{ARF} zusammen mit vCyc

zum autonom ablaufenden Zellzyklus. Dagegen bleibt im KS die Zykluskontrolle über die Regelmechanismen funktionsfähig, wird allerdings über virale Prozesse reguliert.

7.4.3 Vergleich des KS mit dem multizentrischen Typ des Morbus Castleman (MCD)

Im Gegensatz zum monoklonalen PEL liegt beim multizentrischen Typ des Morbus Castleman (MCD) eine lymphoproliferative Dysfunktion vor. Wenige mit HHV 8 infizierte lytische Zellen produzieren im MCD parakrine Faktoren, die nicht-infizierte B-Zellen zum Wachstum stimulieren (Parravicini 1997, Dupin 1999, Katano 2000). Zu diesen Faktoren zählen unter anderem vIL 6, die drei viralen MIP's und vGPCR. Im KS befindet sich ebenfalls ein ganz geringer Anteil an lytischen HHV 8-infizierten Zellen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Großteil der proliferierenden Zellen des KS LANA-negativ ist. Das in Kapitel 7.4.1 dargestellte Modell zeigt, dass möglicherweise die Progression des KS ähnlich wie beim MCD durch diese parakrinen Faktoren bedingt wird. Unklar ist, warum beim KS hauptsächlich Endothelzellen infiziert werden und beim MCD vorrangig B-Zellen betroffen sind.

8 Zusammenfassung

Bei dem Kaposi-Sarkom (KS) handelt es sich um eine eng mit dem Humanen-Herpes-Virus 8 (HHV 8) assoziierte vaskuläre Neoplasie. Die Etablierung eines kommerziell erhältlichen, stabilen Antikörpers gegen das virale „Latenz-assoziierte-nukleäre Antigen“ (LANA) von HHV 8 ermöglicht den Nachweis HHV-8-infizierter Zellen an *Ex-vivo*-Paraffinmaterial. In dieser Arbeit wird diese Methode an einem Kollektiv aus insgesamt 61 Patienten mit HIV-assoziiertem KS angewendet, um einen Beitrag zur Beantwortung von bislang ungeklärten Fragen nach der quantitativen Verteilung von HHV 8 im Organismus und zur formalen Pathogenese des KS zu leisten. Das Kollektiv besteht aus diagnostischen Exzisaten (20 Früh- und 20 Spätstadien des KS) sowie aus 21 Sektionsfällen mit KS wovon Lymphknoten, Leber-, Milz- und Lungengewebe untersucht wurden.

Durch die Etablierung und Auswertung technisch aufwendiger immunhistochemischer Doppelfärbeexperimente mit dem viralen Protein LANA und verschiedenen strukturellen und regulatorischen Humanproteinen (CD31, CD34, Ki67 und p21) sowie durch die Anpassung des LANA-Nachweises an Autolyse- bzw. Sektionsmaterial kommen wir in der vorliegenden Arbeit zu folgenden Ergebnissen:

Die KS-Progression geht von der Proliferation nicht-infizierter Zellen aus. Dies spricht für ein parakrin-stimuliertes KS-Wachstum und stützt Hypothesen, die das KS als viral-getriggerte, reaktive Angioproliferation einstufen. Außerdem unterscheidet dieser Befund das KS von dem ebenfalls HHV-8-assoziiertem „Primären Effusions Lymphom“ (PEL), dessen Progression ein autonomer Zellzyklus zugrunde liegt.

Weitere Ergebnisse dieser Arbeit stützen die mittels In-vitro-Experimenten von Wang et al. aufgestellte Hypothese, dass HHV 8 das

Expressionsmuster der infizierten Zellen in Richtung der endothelialen Vorläuferzelle verändert. Durch Koexpressionsexperimente mit Endothelzellmarkern kann außerdem gezeigt werden, dass die HHV-8-infizierten Zellen an der Gefäßbildung im KS direkt beteiligt sind.

Schließlich lassen sich im Sektionsmaterial HHV-8-infizierte mononukleäre Zellen in mehreren Organen als disseminierte Einzelzellen außerhalb der klinisch/makroskopisch sichtbaren KS-Läsionen nachweisen, und es finden sich mikroskopisch kleine KS-Frühestadien. Der bisher nur *in vitro* durch den Nachweis von HHV-8-infizierten Zellen im Blut vermutete formalpathogenetische Weg, wonach HHV-8-infizierte mononukleäre Zellen zur Infektion der endothelialen KS-„Zielzellen“ beitragen, wird somit *ex vivo* an dem Untersuchungskollektiv histomorphologisch belegt.

9 Literaturverzeichnis

- Adams DH**, Lloyd AR. (1997): Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet*; 349: 490-5.
- Alberts A**, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1994): Molecular biology of the cell. 3rd ed. New York and London: Garland publishing; 734-9.
- Alpan RS**, Pardee AB. (1996): p21WAF1/CIP1/SDI1 is elevated through a p53-independent pathway by mimosine. *Cell Growth Differ.*; 7: 893-901.
- An J**, Lichtenstein AK, Brent G, Rettig MB. (2002): The Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) induces cellular interleukin 6 expression: role of the KSHV latency-associated nuclear antigen and the AP1 response element. *Blood.*; 99: 649-54.
- Andrews RG**, Singer JW, Bernstein ID. (1986): Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood*; 67: 842-5.
- Anthony PP**, Ramani P. (1991): Endothelial markers in malignant vascular tumours of the liver: superiority of QB-END/10 over von Willebrand factor and Ulex europaeus agglutinin 1. *J Clin Pathol.*; 44: 29-32.
- Antman K**, Chang Y. (2000): Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med.*; 342: 1027-38.
- Ambroziak JA**, Blackbourn DJ, Herndier BG, Glogau RG, Gullett JH, McDonald AR, Lennette ET, Levy JA. (1995): Herpes-like sequences in HIV-infected and uninfected Kaposi's sarcoma patients. *Science*; 268: 582-3.
- Aoki Y**, Jaffe ES, Chang Y, Jones K, Teruya-Feldstein J, Moore PS, Tosato G. (1999): Angiogenesis and hematopoiesis induced by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded interleukin-6. *Blood*; 93: 4034-43.
- Aprelikova O**, Xiong Y, and Liu E.T. (1995): Both p16 and p21 families of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors block the phosphorylation of cyclin-dependent kinases by the CDK-activating kinase. *J. Biol. Chem.*; 270: 18195-7.
- Arvanitakis L**, Geras-Raaka E, Varma A, Gershengorn MC, Cesarman E. (1997): Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation. *Nature*; 385: 347-50.
- Athale UH**, Parkin DM, Wabwire-Mangeu (1995): Influence of the HIV epidemic on the influence of Kaposi's sarcoma in Zambian children. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retroviral.*; 8: 96-100

- Bais C**, Santomasso B, Coso O, Arvanitakis L, Raaka EG, Gutkind JS, Asch AS, Cesarman E, Gershengorn MC, Mesri EA, Gerhengorn MC. (1998): G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature*; 391: 86-9.
- Ballestas ME**, Chatis PA, Kaye KM. (1999): Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science*; 284: 641-4.
- Barozzi P**, Luppi M, Facchetti F, Mecucci C, Alu M, Sarid R, Rasini V, Ravazzini L, Rossi E, Festa S, Crescenzi B, Wolf DG, Schulz TF, Torelli G. (2003): Post-transplant Kaposi sarcoma originates from the seeding of donor-derived progenitors. *Nat Med.*; 9: 554-61.
- Baumhüter S**, Dybdal N, Kyle C, Lasky LA. (1994): Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood*; 84: 2554-65.
- Bayley AC**. (1984): Aggressive Kaposi's sarcoma in Zambia, 1983. *Lancet*; 1: 1318-20.
- Bearss DJ**, Lee RJ, Troyer DA, Pestell RG, Windle JJ. (2002): Differential effects of p21(WAF1/CIP1) deficiency on MMTV-ras and MMTV-myc mammary tumor properties. *Cancer Res.*; 62: 2077-84.
- Ben-Bassat H**, Goldblum N, Mitrani S, Goldblum T, Yoffey JM, Cohen MM, Bentwich Z, Ramot B, Klein E, Klein G. (1977): Establishment in continuous culture of a new type of lymphocyte from a "Burkitt like" malignant lymphoma (line D.G.-75). *Int J Cancer*; 19: 27-33.
- Beral V**, Peterman TA, Berkelman RL, Jaffe HW. (1990): Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: a sexually transmitted infection? *Lancet*; 335: 123-8.
- Beschorner WE**, Civin CI, Strauss LC. (1985): Localization of hematopoietic progenitor cells in tissue with the anti-My-10 monoclonal antibody. *Am J Pathol.*; 119: 1-4.
- Biggar RJ**, Rabkin CS. (1996): The epidemiology of AIDS-related neoplasms. *Hematol Oncol Clin North Am.*; 10: 997-1010.
- Bisceglia M**, Bosman C, Quirke P. (1992): A histologic and flow cytometric study of Kaposi's sarcoma. *Cancer*; 69: 793-8.
- Bisgaard K**, Lihme A, Rolsted H, Pluzek KJ. (1993): Polymeric conjugates for enhanced signal generation in enzyme immuno assays. Abstract. *Scandinavian*

Society for Immunology, XXIVth Annual Meeting, University of Aarhus, Aarhus Denmark.

Blackbourn DJ, Lennette ET, Ambroziak J, Mourich DV, Levy JA. (1998): Human herpesvirus 8 detection in nasal secretions and saliva. *J Infect Dis.*; 177: 213-6.

Blackbourn DJ, Osmond D, Levy JA, Lennette ET. (1999): Increased human herpesvirus 8 seroprevalence in young homosexual men who have multiple sex contacts with different partners. *J Infect Dis.*; 179: 237-9.

Blasig C, Zietz C, Haar B, Neipel F, Esser S, Brockmeyer NH, Tschachler E, Colombini S, Ensoli B, Sturzl M. (1997): Monocytes in Kaposi's sarcoma lesions are productively infected by human herpesvirus 8. *J Virol.*; 71: 7963-8.

Boshoff C, Schulz TF, Kennedy MM, Graham AK, Fisher C, Thomas A, McGee JO, Weiss RA, O'Leary JJ. (1995): Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells. *Nat Med*; 1: 1274-78.

Boshoff C, Endo Y, Collins PD, Takeuchi Y, Reeves JD, Schweickart VL, Siani MA, Sasaki T, Williams TJ, Gray PW, Moore PS, Chang Y, Weiss RA. (1997): Angiogenic and HIV-inhibitory functions of KSHV-encoded chemokines. *Science*; 278: 290-4.

Boulaire J, Fotedar A, Fotedar R. (2000): The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1. *Pathol Biol (Paris).*; 48: 190-202.

Brambilla L, Boneschi V, Ferrucci S, Taglioni M, Berti E (2000): Human Herpesvirus 8 infection among heterosexual partners of patients with classical Kaposi's sarcoma. *Br. J. Dermatol.* 143: 1021-25.

Brooks JJ. (1986): Kaposi's sarcoma: a reversible hyperplasia. *Lancet*; 2: 1309-11.

Brousset P, Cesarman E, Meggetto F, Lamant L, Delsol G. (2001): Colocalization of the viral interleukin-6 with latent nuclear antigen-1 of human Herpesvirus 8 in endothelial spindle cells of Kaposi's sarcoma and lymphoid cells of multicentric Castleman's disease. *Hum Pathol.*; 32: 95-100.

Bruno S, Darzynkiewicz Z. (1992): Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki 67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif.*; 25: 31-40.

Butel JS. (2000): Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis*; 21: 405-26.

Camcioglu Y, Picard C, Lacoste V, Dupuis S, Akcakaya N, Cokura H, Kaner G, Demirkesen C, Plancoulaine S, Emile JF, Gessain A, Casanova JL. (2004): HHV

- 8-associated Kaposi sarcoma in a child with IFN γ deficiency. *J Pediatr.*; 144: 519-23.
- Cannell E**, Mitnacht S. (1999): Viral encoded cyclins. *Semin Cancer Biol.*; 9: 221-9.
- Carbone A**, Gloghini A, Vaccher E, Zagonel V, Pastore C, Dalla Palma P, Branz F, Saglio G, Volpe R, Tirelli U, Gaidano G. (1996): Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA sequences in AIDS-related and AIDS-unrelated lymphomatous effusions. *Br J Haematol.*; 94: 533-43.
- Carbone A**, Gaidano G, Gloghini A, Larocca LM, Capello D, Canzonieri V, Antinori A, Tirelli U, Falini B, Della-Favera R. (1998): Differential Expression of BCL-6, CD138/Syndecan-1, and Epstein-Barr Virus-Encoded Latent Membrane Protein-1 Identifies distinct Histogenetic Subsets of Acquired Immunodeficiency Syndrome-related Non-Hodgkin's Lymphomas. *Blood*; 91: 747-55.
- Carbone A**, Gloghini A, Bontempo D, Monini P, Tirelli U, Volpe R, Browning PJ, Gaidano G. (2000): Proliferation in HHV 8-positive primary effusion lymphomas is associated with expression of HHV 8 cyclin but independent of p27(kip1). *Am J Pathol.*; 156: 1209-15.
- Cayrol C**, Flemington EK. (1996): The Epstein-Barr virus bZIP transcription factor Zta causes G0/G1 cell cycle arrest through induction of cyclin-dependent kinase inhibitors. *EMBO J.*; 15: 2748-59.
- Cesarman E**, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. (1995a): Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med.*; 332: 1186-91.
- Cesarman E**, Moore PS, Rao PH, Inghirami G, Knowles DM, Chang Y. (1995b): In vitro establishment and characterization of two acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma cell lines (BC-1 and BC-2) containing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like (KSHV) DNA sequences. *Blood*; 86: 2708-14.
- Cesarman E**, Nador RG, Bai F, Bohenzky RA, Russo JJ, Moore PS, Chang Y, Knowles DM. (1996): Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus contains G protein-coupled receptor and cyclin D homologs which are expressed in Kaposi's sarcoma and malignant lymphoma. *J Virol.*; 70: 8218-23.
- Cesarman E**, Mesri EA, Gershengorn MC. (2000): Viral G protein-coupled receptor and Kaposi's sarcoma: a model of paracrine neoplasia? *J Exp Med.*; 191: 417-22.
- Chang BD**, Watanabe K, Broude EV, Fang J, Poole JC, Kalinichenko TV, Ronninson IB. (2000): Effects of p21 Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications

- for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97: 4291-6.
- Chang Y**, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. (1994): Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*; 266: 1865-9.
- Chang Y**, Moore PS, Talbot SJ, Boshoff CH, Zarkowska T, Godden-Kent, Paterson H, Weiss RA, Mitnacht S. (1996): Cyclin encoded by KS herpesvirus. *Nature*; 382: 410.
- Charles A**, Tang X, Crouch E, Brody JS, Xiao ZX. (2001): Retinoblastoma protein complexes with C/EBP proteins and activates C/EBP-mediated transcription. *J Cell Biochem.*; 83: 414-25.
- Chatterjee M**, Osborne J, Bestetti G, Chang Y, Moore PS. (2002): Viral IL 6-induced cell proliferation and immune evasion of interferon activity. *Science*; 298: 1432-5.
- Chen S**, Bacon KB, Li L, Garcia GE, Xia Y, Lo D, Thompson DA, Siani MA, Yamamoto T, Harrison JK, Feng L. (1998): In vivo inhibition of CC and CX3C chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by vMIP-II. *J Exp Med.*; 188: 193-8.
- Child ES**, Mann DJ. (2001): Novel properties of the cyclin encoded by Human Herpesvirus 8 that facilitate exit from quiescence. *Oncogene*; 20: 3311-22.
- Chin YE**, Kitagawa M, Su WC, You ZH, Iwamoto Y, Fu XY. (1996): Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science*; 272: 719-22.
- Choi J**, Means RE, Damania B, Jung JU. (2001): Molecular piracy of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus. *Cytokine Growth Factor Rev.*; 12: 245-57.
- Civin CI**, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. (1984): Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.*; 133: 157-65.
- Coqueret O**, Gascan H. (2000): Functional interaction of STAT3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21WAF1/CIP1/SDI1. *J Biol Chem.*; 275: 18794-800.
- Chor PJ**, Santa Cruz DJ. (1992): Kaposi's sarcoma. A clinicopathologic review and differential diagnosis. *J Cutan Pathol.*; 19: 6-20.

- Christopher MP**, Simas PJ, Smith VP, Stewart AC, Minson AC, Efstathiou S, Alcami A (2000): A broad spectrum selected chemokine binding protein encoded by herpesvirus. *J Exp Med.*; 191: 573-8.
- Conzen SD**, Cole CN. (1994): The transforming proteins of simian virus 40. *Semin. Virol.*; 5: 349-56.
- Cordell JL**, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY. (1984): Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem.*; 32: 219-29.
- Cotter MA 2nd**, Robertson ES. (1999): The latency-associated nuclear antigen tethers the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome to host chromosomes in body cavity-based lymphoma cells. *Virology*; 264: 254-64.
- Cram EJ**, Ramos RA, Wang EC, Cha HH, Nishio Y, Firestone GL. (1998): Role of the CCAAT/enhancer binding protein-alpha transcription factor in the glucocorticoid stimulation of p21waf1/cip1 gene promoter activity in growth-arrested rat hepatoma cells. *J Biol Chem.*; 273: 2008-14.
- D'Agostino G**, Arico E, Santodonato L, Veniditti M, Sestili P, Masuelli L, Coletti A, Modesti A, Picchio G, Mosier DE, Ferrantini M, Belardelli F. (1999): Type I consensus IFN (IFN-con1) gene transfer into KSHV/HHV 8-infected BCBL-1 cells causes inhibition of viral lytic cycle activation via induction of apoptosis and abrogates tumorigenicity in sCID mice. *J Interferon Cytokine Res.*; 19: 1305-16.
- Dalla-Favera R**, Migliazza A, Chang CC, Niu H, Pasqualucci L, Butler M, Shen Q, Cattoretti G. (1999): Molecular pathogenesis of B cell malignancy: the role of BCL-6. *Curr Top Microbiol Immunol.*; 246:257-65.
- Datto MB**, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF. (1995): Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92: 5545-9.
- Delabesse E**, Oksenhendler E, Lebbe C, Verola O, Varet B, Turhan AG. (1997): Molecular analysis of clonality in Kaposi's sarcoma. *J Clin Pathol.*; 50: 664-8.
- Delavaine L**, La Thangue NB. (1999): Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. *Oncogene*; 18: 5381-92.
- Delia D**, Lampugnani MG, Resnati M, Dejana E, Aiello A, Fontanella E, Soligo D, Pierotti MA, Greaves MF. (1993): CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *Blood*; 81: 1001-8.

- Denis GV**, Green MR. (1996): A novel, mitogen-activated nuclear kinase is related to a *Drosophila* developmental regulator. *Genes Dev.*; 10: 261-71.
- Dittmer D**, Lagunoff M, Renne R, Staskus K, Haase A, Ganem D. (1998): A cluster of latently expressed genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol.*; 72: 8309-15.
- Dotto GP**. (2000): p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta*; 1471: M43-56.
- Du MQ**, Liu H, Diss TC, Ye H, Hamoudi RA, Dupin N, Meignin V, Oksenhendler E, Boshoff C, Isaacson PG. (2001): Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infects monotypic (IgM lambda) but polyclonal naive B cells in Castleman disease and associated lymphoproliferative disorders. *Blood*; 97: 2130-6.
- Du MQ**, Diss TC, Liu H, Ye H, Hamoudi RA, Cabecadas J, Dong HY, Harris NL, Chan JK, Rees JW, Dogan A, Isaacson PG. (2002): KSHV- and EBV-associated germinotropic lymphoproliferative disorder. *Blood*; 100: 3415-8.
- Dukers NH**, Renwick N, Prins M, Geskus RB, Schulz TF, Weverling GJ, Coutinho RA, Goudsmit J. (2000): Risk factors for human herpesvirus 8 seropositivity and seroconversion in a cohort of homosexual men. *Am J Epidemiol.*; 151(3): 213-24.
- Dupin N**, Fisher C, Kellam P, Ariad S, Tulliez M, Franck N, van Marck E, Salmon D, Gorin I, Escande JP, Weiss RA, Alitalo K, Boshoff C. (1999): Distribution of human Herpesvirus 8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease, and primary effusion lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96: 4546-51.
- Dyson N**. (1998): The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.*; 12: 2245-62.
- el-Deiry WS**, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*; 75: 817-25.
- Elledge SJ**, Harper JW. (1995): Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr Opin Cell Biol.*; 6: 847-52.
- Ellis M**, Chew YP, Fallis L, Freddersdorf S, Boshoff C, Weiss RA, Lu X, Mitnacht S. (1997): Degradation of p27(Kip) cdk inhibitor triggered by Kaposi's sarcoma virus cyclin-cdk6 complex. *EMBO J.*; 18: 644-53.
- Ensoli B**, Sirianni MC. (1998): Kaposi's sarcoma pathogenesis: a link between immunology and tumor biology. *Crit Rev Oncog.*; 9: 107-24.

- Enzinger FM**, Weiss SW (Ed.) (1996): Malignant vascular tumors. *In: Soft tissue tumors*. Mosby, St. Louis; 641-77.
- Euvrard S**, Kanitakis J, Claudy A. (2003): Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med*; 24:1681-91.
- Evans LM**, Itri LM, Campion M, Wyler-Plaut R, Krown SE, Groopman JE, Goldsweig H, Volberding PA, West SB, Mitsuyasu RT. (1991): Interferon-alpha 2a in the treatment of acquired immunodeficiency syndrome-related Kaposi's sarcoma. *J Immunother*; 10: 39-50.
- Farge D**, Lebbe C, Marjanovic Z, Tuppin P, Mouquet C, Peraldi MN, Lang P, Hiesse C, Antoine C, Legendre C, Bedrossian J, Gagnadoux MF, Loirat C, Pellet C, Sheldon J, Golmard JL, Agbalika F, Schulz TF. (1999): Human herpes virus-8 and other risk factors for Kaposi's sarcoma in kidney transplant recipients. Groupe Cooperatif de Transplantation d' Ile de France (GCIF). *Transplantation*; 15: 1236-42.
- Feng P**, Scott C, Lee SH, Cho NH, Jung JU. (2004): Manipulation of apoptosis by herpes viruses (Kaposi's sarcoma pathogenesis). *Prog Mol Subcell Biol*; 36: 191-205.
- Fields Virology**, 4th ed, Fields & Knipe, eds, Raven Press, 2001.
- Fina L**, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. (1990): Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*; 75: 2417-26.
- Finlay AY**, Marks R. (1979): Familial Kaposi's sarcoma. *Br J Dermatol*; 100: 323-6.
- Flemington EK**. (2001): Herpesvirus lytic replication and the cell cycle: arresting new developments. *J Virol*; 75: 4475-81.
- Flore O**. (2004): Kaposi's sarcoma. *Lancet*; 364: 740-1.
- Franceschi S**, Geddes M. (1995): Epidemiology of classic Kaposi's sarcoma, with special reference to mediterranean population. *Tumori*; 81: 308-14.
- Friberg J Jr**, Kong W, Hottiger MO, Nabel GJ. (1999): p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature*; 402: 889-94.
- Friedman-Kien AE**. (1981): Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men. *J Am Acad Dermatol*; 5: 468-71.
- Fukushi M**, Higuchi M, Oie M, Tetsuka T, Kasolo F, Ichiyama K, Yamamoto N, Katano H, Sata T, Fujii M. (2003): Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's

sarcoma-associated herpesvirus interacts with human myeloid cell nuclear differentiation antigen induced by interferon alpha. *Virus Genes*.; 27: 237-47.

Gaidano G, Pastore C, Gloghini A, Volpe G, Capello D, Polito P, Vaccher E, Tirelli U, Saglio G, Carbone A. (1997): Human herpesvirus type-8 (HHV 8) in haematopoietic neoplasia. *Leuk Lymphoma*.; 24: 257-66.

Gaidano G, Capello D, Cilia AM, Gloghini A, Perin T, Quattrone S, Migliazza A, Lo Coco F, Saglio G, Ascoli V, Carbone A. (1999): Genetic characterization of HHV 8/KSHV-positive primary effusion lymphoma reveals frequent mutations of BCL6: implications for disease pathogenesis and histogenesis. *Genes Chromosomes Cancer*; 24: 16-23.

Gaidano G, Vivenza D, Forconi F, Capello D, Gloghini A, Bhatia K, Gutierrez M, Gallicchio M, Avanzi GC, Fassone L, Ariatti C, Buonaiuto D, Cingolani A, Saglio G, Tirelli U, Larocca LM, Dalla-Favera R, Carbone A. (2000): Mutation of BAX occurs infrequently in acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer*; 27: 177-82.

Gaidano G, Carbone A. (2001): Primary effusion lymphoma. A liquid phase lymphoma of fluid-filled body cavities. *Adv Cancer Res*.; 80: 115-46.

Giraldo GE, Beth E, Haguenu F. (1972): Herpes-type virus particles in tissue culture of Kaposi's sarcoma from different geographic regions. *J. Natl. Cancer Inst.*; 49: 1509-26.

Giraldo GE, Beth E, Huang ES. (1980): Kaposi's sarcoma and its relationship to cytomegalovirus (CMNV). III. CMV DNA and CMV early antigens in Kaposi's sarcoma. *Int. J. Cancer* 26: 23-29.

Ganem D. (1998): Human herpesvirus 8 and its role in the genesis of Kaposi's sarcoma. *Curr Clin Top Infect Dis*.; 18: 237-51.

Gao Y, Chaudhuri J, Zhu C, Davidson L, Weaver DT, Alt FW. (1998): A targeted DNA-PKcs-null mutation reveals DNA-PK-independent functions for KU in V(D)J recombination. *Immunity*; 9: 367-76.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. (1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki67. *J Immunol*.; 133: 1710-5.

Gerdes J, Becker MH, Key G, Cattoretti G. (1992): Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol*.; 168: 85-6.

- Gill PS**, Tsai YC, Rao AP, Ppruck CH, Zheng T, Harrington WA, Cheung T, Nathwani B, Jones PA. (1998): Evidence for multiclonality in multicentric Kaposi's sarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 95: 8257-61.
- Godden-Kent D**, Talbot SJ, Boshoff C, Chang Y, Moore P, Weiss RA, Mitnacht S. (1997): The cyclin encoded by Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) stimulates cdk6 to phosphorylate the retinoblastoma protein and histone H1. *J Virol.*; 71: 4193-8.
- Gottlieb G.J. and Ackermann A.B.** (1988): Kaposi's Sarcoma: *A Text and Atlas*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Gu Y**, Turck CW, Morgan DO. (1993): Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature*; 366: 707-10.
- Hagemeier C**, Caswell R, Hayhurst G, Sinclair J, Kouzarides T. (1994): Functional interaction between the HCMV IE2 transactivator and the retinoblastoma protein. *EMBO J.*; 13: 2897-903.
- Hall M**, Peters G. (1996): Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res.*; 68: 67-108.
- Hamel PA**, Gill RM, Phillips RA, Gallie BL. (1992): Transcriptional repression of the E2-containing promoters E1aE, c-myc, and RB1 by the product of the RB1 gene. *Mol Cell Biol.*; 12: 3431-8.
- Harper JW**, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. (1993): The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*; 75: 805-16.
- Harris TE**, Albrecht JH, Nakanishi M, Darlington GJ. (2001): CCAAT/enhancer-binding protein- α cooperates with p21 to inhibit cyclin-dependent kinase-2 activity and induces growth arrest independent of DNA binding. *J Biol Chem.*; 276: 29200-9.
- Harvat BL**, Jetten AM. (1996): Gamma-interferon induces an irreversible growth arrest in mid-G1 in mammary epithelial cells which correlates with a block in hyperphosphorylation of retinoblastoma. *Cell Growth Differ.*; 7: 289-300.
- Harwood AR**, Osoba D, Hofstader SL, Goldstein MB, Cardella CJ, Holecek MJ, Kunyetz R, Giammarco RA. (1979): Kaposi's sarcoma in recipients of renal transplants. *Am J Med.*; 67: 759-65.

- Hendricks-Taylor LR**, Darlington GJ. (1995): Inhibition of cell proliferation by C/EBP alpha occurs in many cell types, does not require the presence of p53 or Rb, and is not affected by large T-antigen. *Nucleic Acids Res.*; 23: 4726-33.
- Heyden TS**. (1997): Zellbiologische Untersuchungen zu intrazellulärem Transport, Funktion und Regulation des proliferationsassoziierten Antigen Ki67. *Doctoral thesis at the Freie Universität Berlin, Germany*.
- Ho HH**, Du D, Gershengorn MC. (1999): The N terminus of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor is necessary for high affinity chemokine binding but not for constitutive activity. *J Biol Chem.*; 274: 31327-32.
- Hobeika AC**, Subramaniam PS, Johnson HM. (1997): IFNalpha induces the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in human prostate cancer cells. *Oncogene*; 14: 1165-70.
- Hoischen SH**, Vollmer P, Marz P, Ozbek S, Gotze KS, Peschel C, Jostock T, Geib T, Mullberg J, Mechtersheimer S, Fischer M, Grotzinger J, Galle PR, Rose-John S. (2000): Human herpes virus 8 interleukin-6 homologue triggers gp130 on neuronal and hematopoietic cells. *Eur J Biochem.*; 267: 3604-12.
- Hong A**, Lee CS. (2002): Kaposi's sarcoma: clinico-pathological analysis of human immunodeficiency virus (HIV) and non-HIV associated cases. *Pathol Oncol Res.*; 8: 31-5.
- Hong YK**, Foreman K, Shin JW, Hirakawa S, Curry CL, Sage DR, Libermann T, Dezube BJ, Fingerhuth JD, Detmar M. (2004): Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Genet.*; 36: 683-5.
- Jarviluoma A**, Koopal S, Rasanen S, Makela TP, Ojala PM. (2004): KSHV viral cyclin binds to p27KIP1 in primary effusion lymphomas. *Blood*; 104: 3349-54.
- Jeffrey PD**, Tong L, Pavletich NP. (2000): Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors. *Genes Dev.*; 14: 3115-25.
- Jones KD**, Aoki Y, Chang Y, Moore PS, Yarchoan R, Tosato G. (1999): Involvement of interleukin-10 (IL 10) and viral IL 6 in the spontaneous growth of Kaposi's sarcoma herpesvirus-associated infected primary effusion lymphoma cells. *Blood*; 94: 2871-9.
- Judde JG**, Lacoste V, Briere J, Kassa-Kelembho E, Clyti E, Couppie P, Buchrieser C, Tulliez M, Morvan J, Gessain A. (2000): Monoclonality or oligoclonality of

- human herpesvirus 8 terminal repeat sequences in Kaposi's sarcoma and other diseases. *J Natl Cancer Inst.*; 92: 729-36.
- Kaaya EE**, Parravicini C, Ordonez C, Gendelman R, Berti E, Gallo RC, Biberfeld P. (1995): Heterogeneity of spindle cells in Kaposi's sarcoma: comparison of cells in lesions and in culture. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.*; 10: 295-305.
- Kaaya EE**, Castanos-Velez E, Heiden T, Ekman M, Catrina AI, Kitinya J, Andersson L, Biberfeld P. (2000): Proliferation and apoptosis in the evolution of endemic and acquired immunodeficiency syndrome-related Kaposi's sarcoma. *Med Oncol.*; 17: 325-32.
- Kaldis P.** (1999): The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell Mol Life Sci.*; 55: 284-96.
- Kaldis P**, Ojala PM, Tong L, Makela TP, Solomon MJ. (2001): CAK-independent activation of CDK6 by a viral cyclin. *Mol Biol Cell.*; 12: 3987-99.
- Kamijo T**, Bodner S, van de Kamp E, Randle DH, Sherr CJ. (1999): Tumor spectrum in ARF-deficient mice. *Cancer Res.*; 59: 2217-22.
- Kao GF**, Johnson FB, Sulica VI. (1990): The nature of hyaline (eosinophilic) globules and vascular slits of Kaposi's sarcoma. *Am J Dermatopathol.*; 12: 256-67.
- Kaposi M.** (1872): Idiopathisches multiples Pigmentsarkom der Haut. *Arch Dermatol Syph.*; 4: 265.
- Katano H**, Sato Y, Kurata T, Mori S, Sata T. (1999): High expression of HHV 8-encoded ORF73 protein in spindle-shaped cells of Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol.*; 155: 47-52.
- Katano H**, Sato Y, Kurata T, Mori S, Sata T. (2000): Expression and localization of human herpesvirus 8-encoded proteins in primary effusion lymphoma, Kaposi's sarcoma, and multicentric Castleman's disease. *Virology*; 269: 335-44.
- Katano H**, Sato Y, Sata T. (2001): Expression of p53 and human Herpesvirus 8 (HHV 8)-encoded latency-associated nuclear antigen with inhibition of apoptosis in HHV 8-associated malignancies. *Cancer*; 92: 3076-84.
- Katz FE**, Tindle R, Sutherland DR, Greaves MF. (1985): Identification of a membrane glycoprotein associated with haemopoietic progenitor cells. *Leuk Res.*; 9: 191-8.
- Kedes DH**, Lagunoff M, Renne R, Ganem D. (1996a): Identification of the gene encoding the major latency-associated nuclear antigen of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Clin Invest.*; 100: 2606-10.

- Kedes DH**, Operskalski E, Busch M, Kohn R, Flood J, Ganem D. (1996b): The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nat Med.*; 2: 918-24.
- Kellam P**, Boshoff C, Whitby D, Matthews S, Weiss RA, Talbot SJ. (1997): Identification of a major latent nuclear antigen, LNA-1, in the human herpesvirus 8 genome. *J Hum Virol.*; 1: 19-29.
- Keller ET**, Wanagat J, Ershler WB. (1996): Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. *Front. Biosci.*; 1: d340-d357.
- Kimchi A**. (1992): Cytokine triggered molecular pathways that control cell cycle arrest. *J Cell Biochem.*; 50: 1-9.
- Kirshner JR**, Staskus K, Haase A, Lagunoff M, Ganem D. (1999): Expression of the open reading frame 74 (G-protein-coupled receptor) gene of Kaposi's sarcoma (KS)-associated herpesvirus: implications for KS pathogenesis. *J Virol.*; 73: 6006-14.
- Kitaura H**, Shinshi M, Uchikoshi Y, Ono T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. (2000): Reciprocal regulation via protein-protein interaction between c-Myc and p21(cip1/waf1/sdi1) in DNA replication and transcription. *J Biol Chem.*; 275: 10477-83.
- Kledal TN**, Rosenkilde MM, Coulin F, Simmons G, Johnsen AH, Alouani S, Power CA, Luttichau HR, Gerstoft J, Clapham PR, Clark-Lewis I, Wells TN, Schwartz TW. (1997): A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Science*; 277: 1656-9.
- Klein G**. (1994): Epstein-Barr virus strategy in normal and neoplastic B cells. *Cell*; 77: 791-3.
- Klein B**, Zhang XG, Jourdan M, Content J, Houssiau F, Aarden L, Piechaczyk M, Bataille R. (1989): Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood*; 73: 517-26.
- Knipe DM** and Howley PM. (2001): Kaposi's sarcoma: An overlooked assay of 1882. *AMA Arch Dermatol.*; 77: 542.
- Koelle DM**, Huang ML, Chandran B, Vieira J, Piepkorn M, Corey L. (1998): Frequent detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in saliva of human immunodeficiency virus-infected men: clinical and immunologic correlates. *J Infect Dis.*; 176: 94-102.

- Krown SE**, Real FX, Cunningham-Rundles S, Myskowski PL, Koziner B, Fein S, Mittelman A, Oettgen HF, Safai B. (1983): Preliminary observations on the effect of recombinant leukocyte A interferon in homosexual men with Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med.*; 308: 1071-6.
- Krown SE**. (1998): Interferon-alpha: evolving therapy for AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *J Interferon Cytokine Res.*; 18: 209-14.
- Krown SE**, Li P, Von Roenn JH, Paredes J, Huang J, Testa MA. (2002): Efficacy of low-dose interferon with antiretroviral therapy in Kaposi's sarcoma: a randomized phase II AIDS clinical trials group study. *J Interferon Cytokine Res.*; 22: 295-303.
- Komanduri KV**, Luce JA, McGrath MS, Herndier BG, Ng VL. (1996): The natural history and molecular heterogeneity of HIV-associated primary malignant lymphomatous effusions. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.*; 13: 215-26.
- Land H**, Parada LF, Weinberg RA. (1983): Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature*; 304: 596-602.
- Laman H**, Coverley D, Krude T, Laskey R, Jones N. (2001): Viral cyclin-cyclin-dependent kinase 6 complexes initiate nuclear DNA replication. *Mol Cell Biol.*; 21: 624-35.
- Li JJ**, Huang YQ, Cockerell CJ, Zhang WG, Nicolaides A, Friedman-Kien AE. (1997): Expression and mutation of the tumor suppressor gene p53 in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Am J Dermatopathol.*; 19: 373-8.
- Li M**, Lee H, Yoon DW, Albrecht JC, Fleckenstein B, Neipel F, Jung JU. (1997): Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin. *J Virol.*; 71: 1984-91.
- Lothe F**. (1963): Kaposi's sarcoma in Uganda Africans. *Acta Pathol Microbiol Scand.*; Suppl. 161: 1.
- Luppi M**, Barozzi P, Guaraldi G, Ravazzini L, Rasini V, Spano C, Riva G, Vallerini D, Pinna AD, Torelli G. (2003): Human herpesvirus 8-associated diseases in solid-organ transplantation: importance of viral transmission from the donor. *Clin Infect Dis.*; 37:606-7.
- Mann DJ**, Child ES, Swanton C, Laman H, Jones N. (1999): Modulation of p27(Kip1) levels by the cyclin encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *EMBO J.*; 18: 654-63.

- Martin JN**, Ganem DE, Osmond DH, Page-Shafer KA, Macrae D, Kedes DH. (1998): Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *N Engl J Med.*; 338: 948-54.
- Matsushima AY**, Strauchen JA, Lee G, Scigliano E, Hale EE, Weisse MT, Burstein D, Kamel O, Moore PS, Chang Y. (1999): Posttransplantation plasmacytic proliferations related to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Am J Surg Pathol.*; 23: 1393-400.
- McNutt NS**, Fletcher V, Conant MA. (1983): Early lesions of Kaposi's sarcoma in homosexual men. An ultrastructural comparison with other vascular proliferations in skin. *Am J Pathol.*; 111: 62-77.
- MacPhail LA**, Dekker NP, Regezi JA. (1996): Macrophages and vascular adhesion molecules in oral Kaposi's sarcoma. *J Cutan Pathol.*; 23: 464-72.
- McShea A**, Samuel T, Eppel JT, Galloway DA, Funk JO. (2000): Identification of CIP-1-associated regulator of cyclin B (CARB), a novel p21-binding protein acting in the G2 phase of the cell cycle. *J Biol Chem.*; 275: 23181-6.
- Melamed D**, Tiefenbrun N, Yarden A, Kimchi A. (1993): Interferons and interleukin-6 suppress the DNA-binding activity of E2F in growth-sensitive hematopoietic cells. *Mol Cell Biol.*; 13:5255-65.
- Melbye M**, Cook PM, Hjalgrim H, Begtrup K, Simpson GR, Biggar RJ, Ebbesen P, Schulz TF. (1998): Risk factors for Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV 8) seropositivity in a cohort of homosexual men, 1981-1996. *Int J Cancer*; 77: 543-8.
- Mesri EA**, Cesarman E, Arvanitakis L, Rafii S, Moore MA, Posnett DN, Knowles DM, Asch AS. (1996): Human Herpesvirus 8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a new transmissible virus that infects B cells. *J Exp Med.*; 183(5): 2385-90.
- Mesri EA**. (1999): Inflammatory reactivation and angiogenicity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/HHV8: a missing link in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome-associated Kaposi's sarcoma. *Blood*; 93: 4031-3.
- Molden J**, Chang Y, You Y, Moore PS, Goldsmith MA. (1997): A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded cytokine homolog (vIL 6) activates signaling through the shared gp130 receptor subunit. *J Biol Chem.*; 272: 19625-31.
- Monini P**, Carlini F, Stürzl M, Rimessi P, Superti F, Franco M, Melucci-Vigo G, Cafaro A, Goletti D, Sgadari C, Butto' S, Leone P, Chiozzini C, Barresi C, Tinari A, Bonaccorsi A, Capobianchi MR, Giuliani M, di Carlo A, Andreoni M, Rezza G,

- Ensoli B. (1999): Alpha interferon inhibits human herpesvirus 8 (HHV 8) reactivation in primary effusion lymphoma cells and reduces HHV 8 load in cultured peripheral blood mononuclear cells. *J Virol.* 1999; 73: 4029-41.
- Moore PS, Chang Y (1995): Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma of patients with and without HIV infection. *N Eng J Med.*; 332: 1181-5.
- Moore PS, Boshoff C, Weiss RA, Chang Y. (1996): Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. *Science*; 274: 1739-44.
- Moore PS, Chang Y. (1998): Antiviral activity of tumor-suppressor pathways: clues from molecular piracy by KSHV. *Trends Genet.*; 14: 144-50.
- Moore PS, Chang Y. (2003): Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immunoevasion and tumorigenesis: two sides of the same coin? *Annu Rev Microbiol.*; 57: 609-39.
- Morini M, Albin A, Lorusso G, Moelling K, Lu B, Cilli M, Ferrini S, Noonan DM. (2004): Prevention of angiogenesis by naked DNA IL 12 gene transfer: angioprevention by immunogene therapy. *Gene Ther.*; 11: 284-91.
- Morkel M, Wenkel J, Bannister AJ, Kouzarides T, Hagemeier C. (1997): An E2F-like repressor of transcription. *Nature*; 390: 567-8.
- Murdoch C, Finn A. (2000): Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*; 95: 3032-43.
- Nador RG, Cesarman E, Chadburn A, Dawson DB, Ansari MQ, Sald J, Knowles DM. (1996): Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpes virus. *Blood*; 88: 645-56.
- Neipel F, Albrecht JC, Fleckenstein B. (1997): Cell-homologous genes in the Kaposi's sarcoma-associated rhadinovirus human herpesvirus 8: determinants of its pathogenicity? *J Virol.*; 71: 4187-92.
- Nicholas J, Ruvolo VR, Burns WH, Sandford G, Wan X, Ciufo D, Hendrickson SB, Guo HG, Hayward GS, Reitz MS. (1997): Kaposi's sarcoma-associated human Herpesvirus 8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6. *Nat Med.*; 3: 287-92.
- Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D, Firestein R, Cleary M, Jenuwein T, Herrera RE, Kouzarides T. (2001): Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature*; 412: 561-5.

- Ober WB. (1988):** Kaposi: The man and the sarcoma. In: Kaposi's sarcoma: a text and atlas. *Gottlieb, G.J. and Ackerman, A.B., eds., Philadelphia: Lea and Febiger, 9-22.*
- O'Donovan M,** Silva I, Uhlmann V, Bermingham N, Luttich K, Martin C, Sheils O, Killalea A, Kenny C, Pileri S, O'Leary JJ. **(2001):** Expression profile of human herpesvirus 8 (HHV 8) in pyothorax associated lymphoma and in effusion lymphoma. *Mol Pathol.*; 54: 80-5.
- OETTLE AG. (1992):** Geographical and racial differences in the frequency of Kaposi's sarcoma as evidence of environmental or genetic causes. *Acta Unio Int Contra Cancrum*; 18: 330-63.
- Ojala PM,** Tiainen M, Salven P, Veikkola T, Castanos-Velez E, Sarid R, Biberfeld P, Makela TP. **(1999):** Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded v-cyclin triggers apoptosis in cells with high levels of cyclin-dependent kinase 6. *Cancer Res.*; 59: 4984-9.
- Ojala PM,** Yamamoto K, Castanos-Velez E, Biberfeld P, Korsmeyer SJ, Makela TP. **(2000)** The apoptotic v-cyclin-CDK6 complex phosphorylates and inactivates Bcl-2. *Nat Cell Biol.*; 2: 819-25.
- Oren M. (1999):** Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem.*; 274: 36031-4.
- Orenstein JM,** Alkan S, Blauvelt A, Jeang KT, Weinstein MD, Ganem D, Herndier B **(1997):** Visualisation of human herpesvirus type 8 in Kaposi's sarcoma by light and transmission electron microscopy. *AIDS*; 11: 35-45.
- Orfanos CE. (1983):** Acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and disseminated Kaposi's sarcoma. A new infectious disease? *Hautarzt*; 34: 319-21.
- Osborne J,** Moore PS, Chang Y. **(1999):** KSHV-encoded viral IL 6 activates multiple human IL 6 signaling pathways. *Hum Immunol.*; 60: 921-7.
- Osmond DH,** Buchbinder S, Cheng A, Graves A, Vittinghoff E, Cossen CK, Forghani B, Martin JN. **(2002):** Prevalence of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection in homosexual men at beginning of and during the HIV epidemic. *JAMA.*; 287(2): 221-5.
- Ostrowski J,** Florio SK, Denis GV, Suzuki H, Bomsztyk K. **(1998):** Stimulation of p85/RING3 kinase in multiple organs after systemic administration of mitogens into mice. *Oncogene*; 16: 1223-7.

- Pajic A**, Spitkovsky D, Christoph B, Kempkes B, Schuhmacher M, Staeger MS, Brielmeier M, Ellwart J, Kohlhuber F, Bornkamm GW, Polack A, Eick D. (2000): Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line. *Int J Cancer*; 87: 787-93.
- Parravicini C**, Olsen SJ, Capra M, Poli F, Sirchia G, Gao SJ, Berti E, Nocera A, Rossi E, Bestetti G, Pizzuto M, Galli M, Moroni M, Moore PS, Corbellino M. (1997): Risk of Kaposi's sarcoma-associated herpes virus transmission from donor allografts among Italian posttransplant Kaposi's sarcoma patients. *Blood*; 90: 2826-9.
- Parravicini C**, Chandran B, Corbellino M, Berti E, Paulli M, Moore PS, Chang Y. (2000): Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected diseases: Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease. *Am J Pathol.*; 156: 743-9.
- Paunesku T**, Mittal S, Protic M, Oryhon J, Korolev SV, Joachimiak A, Woloschak GE. (2001): Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol.*; 77: 1007-21.
- Penn I.** (1983): Kaposi's sarcoma in immunosuppressed patients. *J Clin Lab Immunol.*; 12: 1-10.
- Plancoulaine S**, Abel L, van Beveren M, Tregouet DA, Joubert M, Tortevoeye P, de The G, Gessain A. (2000): Human herpesvirus 8 transmission from mother to child and between siblings in an endemic population. *Lancet*; 356: 1062-5.
- Platt GM**, Simpson GR, Mitnacht S, Schulz TF. (1999): Latent nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with RING3, a homolog of the Drosophila female sterile homeotic (fsh) gene. *J Virol.*; 73: 9789-95.
- Platt G**, Carbone A, Mitnacht S. (2002): p16INK4a loss and sensitivity in KSHV associated primary effusion lymphoma. *Oncogene*; 21: 1823-31.
- Pyakurel P**, Massambu C, Castanos-Velez E, Ericsson S, Kaaya E, Biberfeld P, Heiden T. (2004): Human Herpesvirus 8 / Kaposi Sarcoma Herpesvirus Cell Association During Evolution of Kaposi Sarcoma. *J Acquir Immune Defic Syndr.*; 36: 678-83.
- Rabkin CS**, Janz S, Lash A, Coleman AE, Musaba E, Liotta L, Biggar RJ, Zhuang Z. (1997): Monoclonal origin of multicentric Kaposi's sarcoma lesions. *N Engl J Med.*; 336: 988-93.

- Radkov SA**, Kellam P, Boshoff C. (2000): The latent nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. *Nat Med.*; 6: 1121-7.
- Rainbow L**, Platt GM, Simpson GR, Sarid R, Gao SJ, Stoiber H, Herrington CS, Moore PS, Schulz TF. (1997): The 222- to 234-kilodalton latent nuclear protein (LNA) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) is encoded by orf73 and is a component of the latency-associated nuclear antigen. *J Virol.*; 71: 5915-21.
- Reed SI**. (1997): Control of the G1/S transition. *Cancer Surv.* 1997;29:7-23.
- Renne R**, Zhong W, Herndier B, McGrath M, Abbey N, Kedes D, Ganem D. (1996): Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. *Nat Med.*; 2: 342-6.
- Renne R**, Barry C, Dittmer D, Compitello N, Brown PO, Ganem D. (2001): Modulation of cellular and viral gene expression by the latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol.*; 75: 458-68.
- Reitz MS Jr**, Nerurkar LS, Gallo RC. (1999): Perspective on Kaposi's sarcoma: facts, concepts, and conjectures. *J Natl Cancer Inst.*; 91: 1453-8.
- Reynolds WA**, Winkelmann RK, Soule EH. (1965): Kaposi's sarcoma: a clinicopathologic study with particular reference to its relationship to the reticuloendothelial system. *Medicine (Baltimore)*; 44: 419-43.
- Rivas C**, Thlick AE, Parravicini C, Moore PS, Chang Y. (2001): Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA2 is a B-cell-specific latent viral protein that inhibits p53. *J Virol.*; 75: 429-38.
- Roninson IB**. (2002): Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett.*; 179: 1-14.
- Roos G**, Leanderson T, Lundgren E. (1984): Interferon-induced cell cycle changes in human hematopoietic cell lines and fresh leukemic cells. *Cancer Res.*; 44: 2358-62.
- Roth WK**, Brandstetter H, Stürzl M. (1992): Cellular and molecular features of HIV-associated Kaposi's sarcoma. *AIDS*; 6: 895-913.
- Rous P**.(1911): Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. *JAMA*; 56: 198

- Ruley HE. (1983):** Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature*; 304: 602-6.
- Russell Jones R, Orchard G, Zelger B, Wilson Jones E. (1995):** Immunostaining for CD31 and CD34 in Kaposi sarcoma. *J Clin Pathol.*; 48: 1011-6.
- Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chen J, Yan M, Maddalena D, Parry JP, Peruzzi D, Edelman IS, Chang Y, Moore PS. (1996):** Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 14862-7.
- Safai B, Mike V, Giraldo G, Beth E, Good RA. (1980):** Association of Kaposi's sarcoma with second primary malignancies: possible etiopathogenic implications. *Cancer*; 45: 1472-9.
- Sanchez-Beato M, Camacho FI, Martinez-Montero JC, Saez AI, Villuendas R, Sanchez-Verde L, Garcia JF, Piris MA. (1999):** Anomalous high p27/KIP1 expression in a subset of aggressive B-cell lymphomas is associated with cyclin D3 overexpression. p27/KIP1-cyclin D3 colocalization in tumor cells. *Blood*; 94: 765-72.
- Sangfelt O, Erickson S, Einhorn S, Grander D. (1997):** Induction of Cip/Kip and Ink4 cyclin dependent kinase inhibitors by interferon-alpha in hematopoietic cell lines. *Oncogene*; 14: 415-23.
- Sankey EA, More L, Dhillon AP. (1990):** QBEnd/10: a new immunostain for the routine diagnosis of Kaposi's sarcoma. *J Pathol.*; 161: 267-71.
- Sarid R, Flore O, Bohenzky RA, Chang Y, Moore PS. (1998):** Transcription mapping of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genome in a body cavity-based lymphoma cell line (BC-1). *J Virol.*; 72: 1005-12.
- Sawhney N, Hall PA. (1992):** Ki67--structure, function, and new antibodies. *J Pathol.*; 168: 161-2.
- Siegel JH, Janis R, Alper JC, Schutte H, Robbins L, Blaufox MD. (1969):** Disseminated visceral Kaposi's sarcoma. Appearance after human renal homograft operation. *JAMA*; 207: 1493-6.
- Sellers WR, Kaelin WG. (1996):** RB [corrected] as a modulator of transcription. *Biochim Biophys Acta*; 1288: M1-5.
- Sellers WR, Kaelin WG Jr. (1997):** Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol.*; 15: 3301-12.

- Serrano M**, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. (1996): Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell*; 85: 27-37.
- Scheffner M**, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. (1990): The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*; 63: 1129-36.
- Schlüter C**, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J. (1993): The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol.*; 123: 513-22.
- Schöneberg T**, Schultz G, Gudermann T. (1999): Structural basis of G protein-coupled receptor function. *Mol Cell Endocrinol.*; 151: 181-93.
- Scholzen T**, Endl E, Wohlenberg C, van der Sar S, Cowell IG, Gerdes J, Singh PB. (2002): The Ki67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure. *J Pathol.*; 196: 135-44.
- Schulz TF**. (2001): KSHV/HHV8-associated lymphoproliferations in the AIDS setting. *Eur J Cancer.*; 37: 1217-26.
- Schwartz JL**, Muhlbauer JE, Steigbigel RT. (1984): Pre-Kaposi's sarcoma. *J Am Acad Dermatol.*; 11: 377-80.
- Schwartz N**, Beney GE, Auffredou MT, Bourgeade MF, Leca G, Vazquez A. (2000): The expression of p18INK4 and p27kip1 cyclin-dependent kinase inhibitors is regulated differently during human B cell differentiation. *J Immunol.*; 165: 4346-52.
- Scinicariello F**, Dolan MJ, Nedelcu I, Tying SK, Hilliard JK. (1994): Occurrence of human papillomavirus and p53 gene mutations in Kaposi's sarcoma. *Virology*; 203: 153-7.
- Shepherd FA**, Maher E, Cardella C, Cole E, Greig P, Wade JA, Levy G. (1997): Treatment of Kaposi's sarcoma after solid organ transplantation. *J Clin Oncol.*; 15: 2371-7.
- Sherr CJ**. (1995): D-type cyclins. *Trends Biochem Sci.*; 20: 187-90.
- Sherr CJ**. (1996): Cancer cell cycles. *Science*; 274: 1672-7.
- Sherr CJ**. (2000): The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.*; 60: 3689-95.

- Shmueli D**, Shapira Z, Yussim A, Nakache R, Ram Z, Shaharabani E. (1989): The incidence of Kaposi sarcoma in renal transplant patients and its relation to immunosuppression. *Transplant Proc.*; 21: 3209-10.
- Simpson RJ**, Hammacher A, Smith DK, Matthews JM, Ward LD. (1997): Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci.*; 6: 929-55.
- Smith NA**, Sabin CA, Gopal R, Bourboulia D, Labbet W, Boshoff C, Barlow D, Band B, Peters BS, de Ruiter A, Brown DW, Weiss RA, Best JM, Whitby D. (1999): Serologic evidence of human herpesvirus 8 transmission by homosexual but not heterosexual sex. *J Infect Dis.*; 180: 600-6.
- Soulier J**, Grollet L, Oksenhendler E, Cacoub P, Cazals-Hatem D, Babinet P, d'Agay MF, Clauvel JP, Raphael M, Degos L. (1995): Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease. *Blood*; 86: 1276-80.
- Spruck CH**, Won KA, Reed SI. (1999): Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature*; 401: 297-300.
- Starborg M**, Gell K, Brundell E, Hoog C. (1996): The murine Ki67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci.*; 109: 143-53.
- Stark GR**, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. (1998): How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem.*; 67: 227-64.
- Staskus KA**, Zhong W, Gebhard K, Herndier B, Wang H, Renne R, Beneke J, Pudney J, Anderson DJ, Ganem D, Haase AT. (1997): Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells. *J Virol.*; 71: 715-9.
- Stickler MC**, Friedman-Kien AE. (1991): Kaposi's sarcoma. *Clin Dermatol.*; 9: 39-47.
- Stine JT**, Wood C, Hill M, Epp A, Raport CJ, Schweickart VL, Endo Y, Sasaki T, Simmons G, Boshoff C, Clapham P, Chang Y, Moore P, Gray PW, Chantry D. (2000): KSHV-encoded CC chemokine vMIP-III is a CCR4 agonist, stimulates angiogenesis, and selectively chemoattracts TH2 cells. *Blood*; 95: 1151-7.
- Stürzl M**, Ensoli B. (1999): Big but weak: how many pathogenic genes does human Herpesvirus 8 need to cause Kaposi's sarcoma? (Review). *Int J Oncol.*; 14: 287-9.

- Stürzl M**, Zietz C, Monini P, Ensoli B. (2001): Human Herpesvirus 8 and Kaposi's sarcoma: relationship with the multistep concept of tumorigenesis. *Adv Cancer Res.*; 81:125-59.
- Subramaniam PS**, Johnson HM. (1997): A role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in the G1 cell cycle arrest mediated by the type I interferons. *J Interferon Cytokine Res.*; 17: 11-5.
- Sun R**, Lin SF, Staskus K, Gradoville L, Grogan E, Haase A, Miller G. (1999): Kinetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression. *J Virol.*; 73: 2232-42.
- Swanton C**, Mann DJ, Fleckenstein B, Neipel F, Peters G, Jones N. (1997): Herpes viral cyclin/Cdk6 complexes evade inhibition by CDK inhibitor proteins. *Nature.* 1997; 390: 184-7.
- Szekely L**, Kiss C, Mattsson K, Kashuba E, Pokrovskaja K, Juhasz A, Holmvall P, Klein G. (1999): Human Herpesvirus 8-encoded LNA-1 accumulates in heterochromatin-associated nuclear bodies. *J Gen Virol.*; 80: 2889-900.
- Take Y**, Kumano M, Teraoka H, Nishimura S, Okuyama A. (1996): DNA-dependent protein kinase inhibitor (OK-1035) suppresses p21 expression in HCT116 cells containing wild-type p53 induced by adriamycin. *Biochem Biophys Res Commun.*; 221: 207-12.
- Taniguchi T**, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. (2001): IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol.*; 19: 623-55.
- Taub DD**. (1996): Chemokine-leukocyte interactions. The voodoo that they do so well. *Cytokine Growth Factor Rev.*; 7: 355-76.
- Taylor JF**, Templeton AC, Vogel CL, Ziegler JL, Kyalwazi SK. (1971): Kaposi's sarcoma in Uganda: a clinico-pathological study. *Int J Cancer*; 8: 122-35.
- Trimarchi JM**, Fairchild B, Verona R, Moberg K, Andon N, Lees JA. (1998): E2F-6, a member of the E2F family that can behave as a transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95: 2850-5.
- Tupitsyn N**, Kadagidze Z, Gaillard JP, Sholokhova E, Andreeva L, Liautard J, Duperray C, Klein B, Brochier J. (1998): Functional interaction of the gp80 and gp130 IL 6 receptors in human B cell malignancies. *Clin Lab Haematol.*; 20: 345-52.

- Vaccari M**, Della Bella S, Brambilla L, Ferrucci S, Nicola S, Berti E, Boneschi V, Villa ML. (2004): Cytofluorimetric evaluation of peripheral blood dendritic cells in patients with Mediterranean Kaposi's sarcoma. *Minerva Med.*; 94: 379-86.
- Van Bockstaele DR**, Lan J, Snoeck HW, Korthout ML, De Bock RF, Peetermans ME. (1991): Aberrant Ki67 expression in normal bone marrow revealed by multiparameter flow cytometric analysis. *Cytometry*; 12: 50-63.
- Verschuren EW**, Klefstrom J, Evan GI, Jones N. (2002): The oncogenic potential of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus cyclin is exposed by p53 loss in vitro and in vivo. *Cancer Cell.*; 2: 229-41.
- Vieira J**, Huang ML, Koelle DM, Corey L. (1997): Transmissible Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in saliva of men with a history of Kaposi's sarcoma. *J Virol.*; 71: 7083-7.
- Virgin HW** 4th, Latreille P, Wamsley P, Hallsworth K, Weck KE, Dal Canto AJ, Speck SH. (1997): Complete sequence and genomic analysis of murine gammaherpesvirus 68. *J Virol.*; 5894-904.
- Wang HW**, Trotter MW, Lagos D, Bourboulia D, Henderson S, Makinen T, Elliman S, Flanagan AM, Alitalo K, Boshoff C. (2004): Kaposi sarcoma herpesvirus-induced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma. *Nat Genet.*; 36: 687-93.
- Weintraub SJ**, Prater CA, Dean DC. (1992): Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature*; 358: 259-61.
- Werness BA**, Levine AJ, Howley PM. (1990): Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*; 248: 76-9.
- Wölfel T**, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wolfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum Buschenfelde KH, Beach D. (1995): A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science*; 269: 1281-4.
- Wood GS**, Warnke R. (1981): Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. *J Histochem. Cytochem.*; 29: 1196 - 1204.
- Wu L**, Lo P, Yu X, Stoops JK, Forghani B, Zhou ZH. (2000): Three-dimensional structure of the human herpesvirus 8 capsid. *J Virol.*; 74: 9646-54.
- Wu FY**, Tang QQ, Chen H, ApRhys C, Farrell C, Chen J, Fujimuro M, Lane MD, Hayward GS. (2002): Lytic replication-associated protein (RAP) encoded by Kaposi

- sarcoma-associated herpesvirus causes p21CIP-1-mediated G1 cell cycle arrest through CCAAT/enhancer-binding protein- α . *Proc Natl Acad Sci USA*; 99: 10683-8.
- Wu FY**, Chen H, Wang SE, ApRhys CM, Liao G, Fujimuro M, Farrell CJ, Huang J, Hayward SD, Hayward GS. (2003): CCAAT/enhancer binding protein α interacts with ZTA and mediates ZTA-induced p21(CIP-1) accumulation and G(1) cell cycle arrest during the Epstein-Barr virus lytic cycle. *J Virol.*; 77: 1481-500.
- Yang TY**, Chen SC, Leach MW, Manfra D, Homey B, Wiekowski M, Sullivan L, Jenh CH, Narula SK, Chensue SW, Lira SA. (2000): Transgenic expression of the chemokine receptor encoded by human herpesvirus 8 induces an angioproliferative disease resembling Kaposi's sarcoma. *J Exp Med.*; 191: 445-54.
- Zacny VL**, Wilson J, Pagano JS. (1998): The Epstein-Barr virus immediate-early gene product, BRLF1, interacts with the retinoblastoma protein during the viral lytic cycle. *J Virol.*; 72: 8043-51.
- Zhang K**, Kumar R. (1994): Interferon- α inhibits cyclin E- and cyclin D1-dependent CDK-2 kinase activity associated with RB protein and E2F in Daudi cells. *Biochem Biophys Res Commun.*; 200: 522-8.
- Zhong W**, Wang H, Herndier B, Ganem D. (1996): Restricted expression of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genes in Kaposi sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 6641-6.
- Zhu X**, Di Y, Hu C, Wang Z (2002): Expression of positive and negative regulators of cell cycle during wound healing. *Chin Med J (Engl.)*; 115: 326-30.
- Zietz C**, Roessle M, Schmid H, Haas C, Hirschmann A, Sendelhofert A, Stürzl M, Löhrs U. (1998a): [Kaposi-Sarkom: Entzündlich bedingte Gefäßproliferation oder echtes Sarkom] Kaposi's sarcoma: Angiohyperplastic-Inflammatory Lesions Triggered By The Human Herpesvirus 8 or Reak Sarcoma. *Verh Dtsch Ges Path.*; 82: 413-9.
- Zietz C**, Rößle M, Haas C, Sendelhofert A, Hirschmann A, Sturzl M, Lohrs U. (1998b): MDM-2 oncoprotein overexpression, p53 gene mutation, and VEGF up-regulation in angiosarcomas. *Am J Pathol.*; 153: 1425-33.
- Zioga A**, Hantschke M, Klouvas G, Hatzis J. (2004): Hemorrhagic Kaposi sarcoma. Successful treatment with IFN- α . *Eur J Dermatol.*; 14: 37-40.

10 Anhang

Patientendaten

Angiomatoides Frühstadium des KS

Case No.	Sex m/w	Age J	Lokalisation	Stage A/S	LANA (%)	Ki67 ⁺ LANA ⁺ zu LANA (%)	Ki67 ⁺ LANA ⁺ zu Ki67 (%)	p21 ⁺ LANA ⁺ zu LANA (%)	CD31 ⁺ LANA ⁺ zu LANA (%)	CD34 ⁺ LANA ⁺ zu LANA (%)
1	m	29	PE Haut	A	10	6	16	100	94	0
2	m	33	PE Haut	A	34	1	7	94	n.u.	12
3	m	50	PE Haut	A	14	0	0	86	23	83
4	m	34	PE Haut	A	12	0	0	72	n.u.	100
5	m	45	PE Haut	A	36	0	0	20	n.u.	94
6	m	49	PE Haut	A	13	0	0	90	n.u.	100
7	m	44	PE Haut	A	8	1	12	73	n.u.	82
8	m	43	PE Haut	A	10	7	16	78	20	30
9	m	48	PE Haut	A	6	2	2	96	45	76
10	m	56	PE Rücken	A	0	0	0	100	100	100
11	m	44	PE OS re	A	13	4	6	91	n.u.	83
12	m	36	PE Haut	A	21	1	2	73	82	91
13	m	63	PE OS re	A	3	0	0	100	85	50
14	m	36	PE Haut	A	8	0	0	58	100	100
15	m	39	PE re Flanke	A	26	4	12	80	98	89
16	m	44	PE Haut	A	23	1	8	78	95	79
17	m	42	PE Haut	A	13	8	9	75	n.u.	73
18	m	41	PE Haut	A	0	13	27	n.a.	100	94
19	m	36	PE Haut	A	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
20	m	33	PE Haut	A	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mittelwert (angiomatoides Stadium):					13,9	2,7	6,5	80,2	76,5	74,3
<i>Standardabweichung:</i>					<i>10,4</i>	<i>3,7</i>	<i>7,7</i>	<i>19,7</i>	<i>31,5</i>	<i>30,8</i>

Tabelle 6: Patientendaten der KS-Biopsate im angiomatoidem Stadium. Case No. = Fallnummer, Age = Alter, Sex = Geschlecht, Stage = KS-Stadium (A = Angiomatoides Frühstadium, S = Sarkomatoides Spätstadium), m = männlich, w = weiblich, J = Jahre, n.a. = nicht auswertbar, n.u. = nicht untersucht.

Sarkomatoides Spätstadium des KS

Case	Sex	Age	Probeentnahme (PE)	Stage	LANA	Ki67 ⁺ LANA ⁺ zu LANA	Ki67 ⁺ LANA ⁺ zu Ki67	p21 ⁺ LANA ⁺ zu LANA	CD31 ⁺ LANA ⁺ zu LANA	CD34 ⁺ LANA ⁺ zu LANA
No.	m/w	J	Lokalisation	A/S	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
21	m	33	PE Sinus Piriformis	S	75	9	34	89	100	20
22	m	35	LK Hals	S	52	2	21	99	87	100
23	m	43	PE Gehörgang re	S	65	1	12	93	27	100
24	m	47	PE M-Schleimhaut	S	44	1	20	85	98	100
25	m	54	Uvula	S	70	13	25	99	89	n.a.
26	m	49	PE Haut	S	66	8	27	100	n.a.	100
27	m	37	LK	S	61	4	19	98	92	100
28	m	36	PE-Weichgewebe	S	51	4	20	99	81	100
29	m	42	PE Weichgewebe	S	49	4	16	90	100	100
30	m	24	PE LK	S	77	3	20	37	32	90
31	m	40	PE M-Schleimhaut	S	78	9	24	94	100	80
32	m	35	PE-Weichgewebe	S	72	4	17	90	n.a.	80
33	m	33	PE-Weichgewebe	S	72	4	17	95	42	100
34	m	32	PE LK	S	71	3	22	99	n.a.	100
35	m	61	PE Tumor perianal	S	70	3	30	52	100	20
36	m	38	PE Gaumenbogen	S	83	6	11	n.a.	84	100
37	m	59	PE M-Schleimhaut	S	72	3	18	50	n.a.	80
38	m	34	PE Zungengrund	S	71	19	16	50	n.a.	100
39	m	35	PE Haut	S	83	4	21	50	100	100
40	m	59	PE Rachen	S	74	3	17	50	77	50
Mittelwert (sarkomatoides Stadium):					67,8	5,4	20,4	79,9	80,6	85,3
<i>Standardabweichung:</i>					<i>11,1</i>	<i>4,4</i>	<i>5,6</i>	<i>22,7</i>	<i>25,6</i>	<i>26,3</i>

Tabelle 7: Patientendaten der KS-Biopsate im sarkomatoidem Stadium. Case No. = Fallnummer, Age = Alter, Sex = Geschlecht, Stage = KS-Stadium (A = Angiomatoides Frühstadium, S = Sarkomatoides Spätstadium), m = männlich, w = weiblich, J = Jahre,

Nachweis von LANA in Geweben von Sektionsfällen

Case	Sex	Age	Nachweis von mononukleären LANA-positiven Zellen in:				
	m/w	J	KS	LK	Lunge	Milz	Leber
Sek. 1	m	44	+	-	-	n.u.	n.u.
Sek. 2	m	44	+	-	-	n.u.	n.u.
Sek. 3	m	50	+	-	n.u.	-	-
Sek. 4	m	40	+	-	-	-	-
Sek. 5	m	27	+	KS	+	+	+
Sek. 6	m	44	+	KS	KS	+	+
Sek. 7	m	34	+	KS	-	-	-
Sek. 8	m	25	+	KS	KS	KS	-
Sek. 9	m	41	+	KS	KS	-	-
Sek. 10	m	29	+	-	-	-	-
Sek. 11	m	40	+	KS	-	-	-
Sek. 12	m	34	+	n.u.	-	-	-
Sek. 13	m	42	+	KS	-	+	-
Sek. 14	m	70	+	KS	-	-	-
Sek. 15	m	26	+	-	KS	-	-
Sek. 16	m	36	+	+	KS	n.u.	n.u.
Sek. 17	m	48	+	+	+	+	+
Sek. 18	m	66	+	+	+	+	-
Sek. 19	m	35	+	n.u.	-	+	-
Sek. 20	m	43	+	n.u.	KS	+	-
Sek. 21	m	30	+	n.u.	-	n.u.	-

Tabelle 8: Nachweis von mononukleären LANA-positiven Zellen in diversen Geweben von Sektionsfällen. KS = Kaposi-Sarkom, LK = Lymphknoten, n.u. = nicht untersucht.

Parameter der Immunhistochemischen Monoexpression

Primär-Antikörper	Hersteller	Verdünnung/ Medium	Parameter Vorbehandlung	Parameter Inkubation	Detektiions- Kit	Peroxidase- Block
BAX	Zymed	1:150/DM	30' TRS9 MW	60' RT	ABC Elite	H ₂ O ₂
BCL-2	DAKO	1:30/DM	30' TRS6 MW	60' RT	ABC Elite	H ₂ O ₂
BCL-X _L	Zymed	1:50/DM	30' TRS6 MW	60' RT	ABC Elite	H ₂ O ₂
CD31	DAKO	1:30	30' Prot.24, RT	60' RT	APAAP-M	-
CD34	Serotec	1:50	-	60' RT	APAAP-M	-
LANA (HHV 8)	ABI (Tebu)	1:8000/DM	30' TRS6 MW	60' RT	ABC-Elite-Rat	H ₂ O ₂
MIB-1 (Ki67)	Dianova	1:50/DM	30' TRS6 MW	60' RT	APAAP-M	-
P21	Oncogene	1:100/DM	30' TRS6 MW	60' RT	LSAB	H ₂ O ₂
P53	DAKO	1:20/RM	30' Citrat MW	60' RT	LSAB	H ₂ O ₂

Tabelle 9: Parameter der immunhistochemischen Monoexpressionen der Primärantikörper, die in der Arbeit für die Koexpression ausgetestet werden (Abkürzungen: s. Abkürzungsverzeichnis)

Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

3-Amino-9-Ethyl-Carbazol, Art. A-5754, Sigma

AEC+, rot, Ready-To-Use, Art. K-3461, DAKO

Aqua ad iniectionabilia, Art. BBR3000970, Braun

Aqua dest, Institutseigene Destillationsanlage

BCIP/NBT®, blau-violett, SK-5400, Vector

Brutschränke 55°C; 37°C

Blockingreagenz für endogene Peroxidase, S-2001, DAKO

Brij-Konzentrat (Brij 35), Art. 1894, Merck

DAB+, braun, Ready-To-Use, Art. K-3467, DAKO

DAB(Cobalt) = HistoMark BLACK, schwarz, Art. 54-75-00, KPL

DAB(Kupfer) = HistoMark ORANGE, orange, Art. 54-74-00, KPL

“DAKO-Medium” = Antibody Diluent with Background Reducing Components,

Art. S-3022, DAKO

Deckgläser, Menzel

Aqua bidest, Kerndl

DMSO (Dimethylsulfoxid), Art. 2912, Merck

Dinatriumhydrogenphosphat p.A., Art. 6580, Merck

Eppendorf Reaktionsgefäße, Eppendorf

Ethanol absolut, Art. 100983, Merck

Faranount Aqueous, Art. S-3025, DAKO

Fast red, rot, Art. F-4523, Sigma

Formaldehyd (37 %), Sigma

Hämatoxylin, Art. H-3401, Vector

Humanserum, Art. H-1388, Sigma

Kaisers Glyceringelatine, Art. 9242, Merck

Mikrotom, Jung

Mikrotomklingen, Feather

Natriumacid, Art. S-2002, Sigma

Natriumchlorid p.A., Art. 6404, Merck

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat p.A., Art. 6346, Merck

Natronlauge 1N, Art. 9137, Merck

Orcein, Art. 71-01-01, KPL

Paraplast, Vogel

Perhydrol p.A. 30 %, Art. 7209, Merck

PT= 0,1% Proteinase XXIV, Art. P-8038, Sigma-Aldrich

Rinderserum, Art. S-9115, Biochrom

RPMI 1640 Medium (10x), Art. F-1225, Biochrom

Salzsäure (1 N), Art. 1789, Merck

SuperFrost/Plus-Objektträger, Art. 041300, Menzel

TRS-6 (Target retrieval solution ph 6, 10x), Art. S-1699, DAKO

TRS-9: (Target retrieval solution ph 6, 10x), Art. S-3307, DAKO

Tri-Natriumzitat-Dihydrat p.A., Art. 6448, Merck

Trisma-Base (Trometamol), Art. T-1503, Sigma

Trismahydrochlorid, Art. T-3253, Sigma

True-Blue, blau, Art. 71-00-65, KPL

TPX Plastikkuvetten für die Mikrowelle, Braun

Vectamount, Art. H-5000, Vector

Vector blue®, blau, Art. SK-5300, Vector

Vector NovaRED®, rot, SK-4800, Vector

Vector Sg®, blau-grau, Art. SK-4700, Vector

Vector VIP®, violett, Art. SK-4600, Vector

Xylol, Art. 8681, Merck

Zitronensäure-Monohydrat p.A., Art. 0244, Merck

Rezepturen

3-Amino-9-Ethyl-Carbazol-Lösung (AEC-Lösung)

20 mg AEC
lösen in:
12 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)
100 ml PBS-Puffer für AEC-Lösung
ad 200 ml Aqua dest.
10 µl Perhydrol p.A.
mischen, filtern

Brij-Stammlösung

60 ml Tris-Puffer
20 ml Brij-Konzentrat

Citrat-Puffer

9 ml Stammlösung A (21,01 g 0,1 M Zitronensäure ad 1000 ml Aqua dest.)
41 ml Stammlösung B (29,41 g 0,1 M Natriumcitrat ad 1000 ml Aqua dest.)
450 ml Aqua dest.
einstellen auf pH 6

Blockierung von HRP-Systemen bei Koexpressionen (Speel 1994)

10 ml 1N HCl
90 ml Aqua dest.

7,5 % H_2O_2 -Lösung

150 ml H_2O
50 ml 30 % H_2O_2 p.A.

PBS-(Phosphat gepuffertes Salin) für AEC-Lösung

0,93 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat p.A.

3,18 g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat p.A.

21,03 g Natriumchlorid p.A.

lösen in:

ad 2,5 l Aqua dest.

5 ml Brij-Konzentrat (Brij 35)

pH auf 5 – 5,5 einstellen mit 1 N HCl

„Rotes Medium“

225 ml Aqua ad iniectabilia (Braun)

25 ml RPMI 1640 Medium (10x Konzentrat)

25 ml Rinderserum, inaktiviert

0,250 g Natriumazid

pH auf 7,4 mit 1 N NaOH einstellen

Tris-Brij-Puffer

5 l Tris-Puffer

5 ml Brij-Stammlösung

Tris-Puffer

43,90 g Natriumchlorid p.A.

34,25 g Trismahydrochlorid

4,5 g Trisma-Base (Trometamol)

as 5 l Aqua dest.

pH auf 7,5 einstellen

Detektionskits für die Immunhistochemie

ABC-Elite[®]-Peroxidase Kit (**Mouse+Rabbit** IgG), Art. PK-6200, Vector

ABC-Elite[®]-Peroxidase Kit (**Rat** IgG), Art. PK-6104, Vector

LSAB-Kit (System 500), Art. K-0681, DAKO

Envision[®]-HRP, Art. K-4000, DAKO

APAAP-Maus:

Sekundärantikörper: Immunglobuline (polyklonal, Rabbit Anti-Maus), Art. Z-0259, DAKO, ansetzen 1:25 mit der Stammlösung (Humanserum : Rotes Medium = 1:7)

Anti-AP Antikörper (Maus, Monoklonal), Art. D-0651, DAKO ansetzen 1 : 50 mit „Rotem Medium“

APAAP-Ratte:

Sekundärantikörper: Immunglobuline (polyklonal, Rabbit Anti-Rat), Art. Z-0455, DAKO ansetzen 1:50 mit der Stammlösung (Humanserum : Rotes Medium = 1:7)

Anti-AP Antikörper (Ratte, Monoklonal) Art. D-0488, DAKO ansetzen 1:50 mit „Rotem Medium“

APAAP spezial: Detection Kit APAAP, Mouse, Art. K-5000, DAKO

Daraus verwendete Reagenzien:

A: Sekundärantikörper (Ready-To-Use)

B: Anti-AP-Antikörper (Ready-To-Use)

Firmenverzeichnis

<i>Advanced Biotechnologies®</i>	<i>Columbia, USA</i>
<i>Biochrom AG</i>	<i>Berlin</i>
<i>Boehringer®</i>	<i>Mannheim</i>
<i>Braun®</i>	<i>Melsungen</i>
<i>Calbiochem®</i>	<i>Cambridge, USA</i>
<i>DAKO®</i>	<i>Carpinteria, USA</i>
<i>Dianova®</i>	<i>Hamburg</i>
<i>Feather®</i>	<i>Tokio, Japan</i>
<i>Jung®</i>	<i>Heidelberg</i>
<i>Kerndl®</i>	<i>Weißfeld</i>
<i>KPL®</i>	<i>Gaithersburg, USA</i>
<i>Menzel®</i>	<i>Wiesbaden</i>
<i>Merck®</i>	<i>Darmstadt</i>
<i>Microm International®</i>	<i>Walldorf</i>
<i>Novocastra®</i>	<i>Newcastle, UK</i>
<i>Oncogene®</i>	<i>Darmstadt</i>
<i>Serotec®</i>	<i>Wiesbaden</i>
<i>Sigma®</i>	<i>St. Louis, USA</i>
<i>Sigma-Aldrich® Chemie</i>	<i>Deisenhofen</i>
<i>Vector® Laboratories</i>	<i>Burlingame, USA</i>
<i>Vogel®</i>	<i>Giessen</i>
<i>Zymed®</i>	<i>San Francisco, USA</i>

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in Hinblick auf diese Arbeit direkt oder indirekt unterstützt haben.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Udo Löhrs, Leiter des Pathologischen Instituts bis Ende 2005, und Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann, Leiter des Graduiertenkollegs *Infektion und Immunität*, für die Vergabe der Doktorarbeit und des Stipendiums, die Bereitstellung des Laborplatzes und der Mittel.

Der Deutschen Forschungsgesellschaft danke ich für die finanzielle und materielle Unterstützung in Form des Promotionsstipendiums.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Christian Zietz, für die Betreuung, die vielen wissenschaftlichen Debatten, Ratschläge und die vielseitige Unterstützung.

Den Mitarbeitern des Pathologischen Instituts, insbesondere Andrea Sendelhofert, Astrid Hirschmann und Sina Heydrich, danke ich für die vorbildliche Einarbeitung in die Labortätigkeiten.

Bei Dr. Christoph Jacobi und allen Teilnehmern des Graduiertenkollegs möchte ich mich für ihre Unterstützung und die produktiven Seminare bedanken.

Für die Einführung in die Arbeit mit Zellkulturen am Institut für Molekulare Virologie der GSF in Neubiberg möchte ich mich ganz besonders bei Prof. Dr. Michael Stürzl, Dr. Thomas Grimm und allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bedanken.

Ich danke meinen Schwestern Swantje und Julia Lorenz ,und nicht zuletzt Martina Reinhold für die vielen stilistischen Tipps. Meiner Frau, Franziska Lorenz, und meinen beiden Kindern, Katinka und Anneline, danke ich für die Unterstützung und den lebhaften Ausgleich.

Lebenslauf

Peter Nikolai Lorenz, geboren am 09. Dezember 1974 in Darmstadt als viertes Kind von Dr. ing. Rudolf Werner Lorenz und Heidi Lorenz, geb. Worzewski.

Werdegang

1991 – 1992	Austauschjahr in Kansas, USA mit <i>YFU</i>
1995	Abitur in Groß-Bieberau
1995 – 1997	Anderer Dienst im Ausland mit <i>Aktion Sühnezeichen Friedensdienste</i> in Amsterdam, Niederlande
1997 – 2004	Studium der Humanmedizin, LMU München
2004 – 2007	Promotionsstudium Humanmedizin, LMU München
04/1999	Ärztliche Vorprüfung
03/2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02/2005	Approbation als Arzt
seit 04/2005	Assistenzarzt, Innere Medizin, Medizinische Poliklinik Innenstadt, Klinikum der LMU

Stipendium

Promotionsstipendium der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) im Rahmen des Graduiertenkollegs *Infektion und Immunität* unter Leitung von Prof. Heesemann.